



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia
2011

Paula Cristina da Silva Costa **Determinação dos genótipos do VHB por um método de sequenciação direta**



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia
2011

Paula Cristina da Silva Costa **Determinação dos genótipos do VHB por um método de sequenciação direta**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica da Doutora Lucinda Queirós, Médica, Chefe de Serviço de Imunohemoterapia, Laboratório de Agentes Transmissíveis, CRSP-IPS, e da Professora Doutora Adelaide Almeida, Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Dedico este trabalho aos meus filhos Inês e Duarte, pelo sofrimento que lhes causou a minha ausência.

Ao meu marido e aos meus pais por toda a compreensão, apoio e incentivo.

o júri

presidente

Prof. Dra. Maria de Lourdes Gomes Pereira

Professora Associada do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Dra. Maria Lucinda de Magalhães Queirós Ribeiro

Chefe de Serviço de Imunohemoterapia do Centro Regional de Sangue do Porto – Instituto Português do Sangue

Dr. Jorge Manuel Condeço Ribeiro

Assistente Graduado de Saúde Pública do Centro Regional de Sangue do Porto – Instituto Português do Sangue

Prof. Dra. Adelaide Almeida

Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

agradecimentos

À Dra. Lucinda Queirós, pela oportunidade que me deu em realizar este trabalho, pelo incentivo, acompanhamento e orientação prestados durante todo o processo de realização do mesmo.

À Professora Dra. Adelaide Almeida, pela disponibilidade, orientação e pelas sugestões que contribuíram para o aperfeiçoamento desta dissertação.

Às minhas colegas Ana e Manuela, pela colaboração e acompanhamento no trabalho, pela partilha do saber, mas acima de tudo pela amizade e carinho que sempre demonstraram e que tão importante foi para mim.

Aos meus colegas do sector, pelo apoio e compreensão demonstrados ao longo da realização deste trabalho.

A todos os que de alguma forma contribuíram para que este trabalho se tornasse realidade.

palavras-chave

Vírus da Hepatite B, genética, complicações, tratamento antiviral, sequenciação directa, mutações.

resumo

Em Portugal desconhece-se com precisão a prevalência da Hepatite B, no entanto, é considerado um país de endemicidade baixa a intermédia. A influência dos genótipos do Vírus da Hepatite B (VHB) na infecção crónica tem sido mais intensamente estudada em populações onde a prevalência da doença é alta. Dos trabalhos publicados com a determinação dos genótipos em Portugal, poucos caracterizam a população de indivíduos infectados pelo VHB.

Actualmente existe um grande interesse em identificar os genótipos do VHB mais prevalentes uma vez que estes podem influenciar na gravidade da doença, designadamente na evolução para as formas mais graves como cirrose e o carcinoma hepatocelular, e também na resposta ao tratamento antivírico, como é sugerido por estudos recentes.

Foi definido como objectivo principal deste trabalho determinar os genótipos do vírus da Hepatite B nas amostras de doentes com Hepatite B crónica enviadas para estudo ao Centro Regional de Sangue do Porto pelos hospitais da zona Norte, que possuem protocolo para estudos analíticos por biologia molecular. Adicionalmente e como objectivo secundário, determinaram-se também as mutações que conferem resistência aos fármacos actualmente utilizados na terapêutica.

Os genótipos foram determinados por um método de sequenciação directa usando o teste TRUGENE[®] HBV Genotyping comercializado pela SIEMENS[®].

Os resultados obtidos indicam que o genótipo D é o mais predominante (62%) seguido do genótipo A (32%). A prevalência de mutações que conferem resistência aos fármacos foi de 13,4%. Todas as mutações determinadas conferem resistência à lamivudina sendo também observadas resistências para o entecavir e adefovir.

A predominância dos genótipos do presente trabalho coincidiu com a observada em outros estudos idênticos realizados em Portugal bem como com o está referido para o Sul da Europa ou base mediterrânea, na literatura consultada.

keywords

Hepatitis B virus, Genetics, complications, antiviral treatment, direct sequencing, mutations.

abstract

In Portugal, the exact prevalence of Hepatitis B is unknown; however it has a low to medium level of endemicity. The influence of the Hepatitis B virus (HBV) genotypes on chronic infection has been vastly studied in populations with high prevalence. Of all the studies published in Portugal regarding the determination of genotypes, very few focus on the HBV infected population.

Nowadays, there is great interest in identifying the most prevalent genotypes of HBV, once these may have an influence on the illness severity, mainly on its evolution towards more severe forms, like cirrhosis and hepatocellular carcinoma, as well as on the response to the antiviral treatment, as suggested in recent studies.

The main purpose of this study is to determine the HBV genotypes in chronic HBV patients samples sent to the Centro Regional de Sangue do Porto by hospitals in the North region that have a bio-molecular analytical studies protocol. In addition, it has also been determined the mutations which offer resistance to drugs used in current therapy.

The genotypes were determined through a direct sequencing method using the TRUGENE[®] HBV Genotyping test developed by SIEMENS.

The results show that genotype D is the most predominant (62%), followed by genotype A (32%). The prevalence of mutations that offer resistance to drugs was 13,4%. All determined mutations offer resistance to lamivudina. Resistance to entecavir and adefovir was also been observed.

The genotype predominance of this study coincides with that observed in similar studies conducted in Portugal and with what is referred to in the literature for Southern Europe or Mediterranean base.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

1 – INTRODUÇÃO	1
1.1 – HEPATITE B	1
1.2 – EPIDEMIOLOGIA DA HEPATITE B	2
1.3 – VÍRUS DA HEPATITE B	5
1.3.1 - CARACTERIZAÇÃO DO VHB	5
1.3.2 - REPLICAÇÃO E CICLO DE VIDA DO VHB	7
1.3.3 - VARIABILIDADE GENÉTICA DO VHB	8
1.3.3.1 – SUBTIPOS	8
1.3.3.2 – GENÓTIPOS	9
1.3.4 – MUTAÇÕES NO GENOMA DO VHB	12
1.3.4.1 - MUTAÇÕES NA REGIÃO S	13
1.3.4.2 - MUTAÇÕES NA REGIÃO PRÉ-CORE E CORE	13
1.3.4.3 - MUTAÇÕES NA REGIÃO X	13
1.3.4.4 - MUTAÇÕES NA REGIÃO P	13
1.4 – DIAGNÓSTICO	14
1.5 - TRATAMENTO DOS DOENTES CRÓNICOS	15
2 - OBJECTIVOS	20
3 – MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1 - IDENTIFICAÇÃO DA POPULAÇÃO EM ESTUDO E DA AMOSTRA	21
3.2 - METODOLOGIA	21
3.2.1 - AMOSTRAS E CONTROLOS	21
3.2.2 - QUANTIFICAÇÃO DO ADN DO VHB	21
3.2.3 - GENOTIPAGEM DO VHB PELO TRUGENE® HBV GENOTYPING	22

4 – RESULTADOS	28
4.1 - RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DOS GENÓTIPOS	29
4.2 - COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS COM OUTROS ESTUDOS	33
4.3 - RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DAS MUTAÇÕES	35
5 – DISCUSSÃO	38
6 – CONCLUSÕES	44
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

LISTA DE ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
AASLD	American Association for the study of liver diseases
ACD	Anticoagulante citrato dextrose
AcHBc	Anticorpo contra o antígeno do core do VHB
AcHBe	Anticorpo contra antígeno “e” do VHB
AcHBs	Anticorpo contra o antígeno de superfície do VHB
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADV	Adefovir
AgHBc	Antígeno do core do VHB
AgHBe	Antígeno “e” do VHB
AgHBs	Antígeno de superfície do VHB
ALT	Alanina aminotransferases
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensageiro
ASIS	Aplicação de sistema de informação de sangue
cccDNA	Covalently closed circular DNA
CCH	Carcinoma hepatocelular
CMV	Citomegalovírus
CRSP	Centro Regional de Sangue do Porto
CV	Carga vírica
ddATP	Didesoxiadenosina trifosfato.
ddCTP	Didesoxicitidina trifosfato.
ddGTP	Didesoxiguanosina trifosfato
ddNTP _s	Didesoxinucleótidos trifosfato
ddTTP	Didesoxitimidina trifosfato.
DGS	Direcção Geral da Saúde
EASL	European Association for the Study of the Liver
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ETV	Entecavir
Gene Pol	Gene da polimerase
Gene S	Gene do antígeno de superfície (AgHBs)
IFN α	Interferão α
IgHB	Imunoglobulinas específicas contra o vírus da Hepatite B
IOB	Infecção Oculta pelo vírus da hepatite B

IPS	Instituto Português do Sangue
LdT	Telvibudina
LMV	Lamivudina
mL	Mililitro
nt	Nucleotídeos
OMS	Organização Mundial de Saúde
pb	Pares de bases
PCR	Reacção em Cadeia da Polimerase
pegIFN α	Interferão peguilado
PNV	Plano Nacional de Vacinação
PQ	Padrão de quantificação
RFLP	Restriction fragment length polymorphism analysis
rt	Transcriptase reversa
TDF	Tenofovir
UI	Unidades Internacionais
UI/mL	Unidades Internacionais/mililitro
VHB	Vírus da Hepatite B
VHC	Vírus da Hepatite C
VIH	Vírus da imunodeficiência Humana
μ L	Microlitros

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Prevalência da infecção pelo VHB no mundo	2
Figura 2.	Número de casos de hepatite B notificados à Direcção Geral de Saúde por anos	4
Figura 3.	Esquema representativo da estrutura do VHB	5
Figura 4.	Estrutura e organização do genoma do vírus da hepatite B (Clements et al 2010)	6
Figura 5.	Representação do ciclo replicativo VHB	7
Figura 6.	Distribuição geográfica dos genótipos e subgenótipos do VHB (Schaefer, 2007)	11
Figura 7.	Esquema representativo do gene da polimerase (gene Pol) do VHB (Sablon and Shapiro, 2005)	18
Figura 8.	Distribuição das amostras pelas causas que justificaram a não determinação do genótipo do VHB	28
Figura 9.	Distribuição das idades dos doentes em estudo	29
Figura 10.	Distribuição por sexo dos doentes estudados	30
Figura 11.	Distribuição dos genótipos das amostras com genotipagem determinada pelo Trugene® HBV Genotyping	30
Figura 12.	Distribuição das idades dos doentes estudados pelos genótipos A e D	31
Figura 13.	Distribuição da carga vírica (CV) das amostras pelos genótipos A e D	32
Figura 14.	Distribuição da homologia obtida na genotipagem das amostras para os genótipos A e D	32
Figura 15.	Distribuição da homologia obtida na genotipagem dos controlos positivos (CP) inseridos nas diferentes séries de testes realizados	33
Figura 16.	Comparação dos IC _{95%} para a prevalência dos genótipos D em 4 estudos	34

Figura 17.	Comparação dos IC _{95%} para a prevalência dos genótipos A em 4 estudos	34
Figura 18.	Distribuição do total das amostras com resistências aos fármacos: lamivudina (LMV), entecavir (ETV) e adefovir (ADF)	36
Figura 19.	Distribuição do total das amostras com resistências aos fármacos lamivudina (LMV), entecavir (ETV) e adefovir (ADF), pelos genótipos A e D	36
Figura 20.	Distribuição da frequência das mutações observadas na amostra	37
Figura 21.	Associação da mutação e respectiva(s) resistência(s) ao(s) fármaco(s)	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Aminoácidos que especificam os Subtipos do AgHBs do VHB.....	9
Tabela 2.	Genótipos do VHB (Adaptado Stuyver et al. 2001)	10
Tabela 3.	Localização das mutações de resistência associadas aos análogos de nucleosídeos/nucleotídeos nos domínios do gene Pol do VHB (Poordad and Chee, 2010)	19
Tabela 4.	Resumo dos Processos envolvidos na determinação dos Genótipos do VHB pelo Trugene ® HBV Genotyping	23
Tabela 5.	Programa de ciclos utilizados na amplificação por PCR e sequenciação CLIP no termociclador Perkin Elmer 9600 (Bula nº 10469332 Bula nº 10469332 Rev.A, 2008-06)	25
Tabela 6.	Total de amostras com genotipagem do VHB realizadas no CRSP no período do estudo	28
Tabela 7.	Caracterização da amostra submetida a genotipagem do VHB	29
Tabela 8.	Características dos doentes estudados por genótipos	31
Tabela 9.	Características dos doentes com genótipo A e D que possuem mutações que conferem resistências aos fármacos	35

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – HEPATITE B

A infecção pelo vírus da hepatite B (VHB) continua a ser um importante problema de saúde pública mundial, mesmo existindo uma vacina preventiva altamente eficaz. Estima-se que existam dois bilhões de pessoas (um terço da população mundial) com evidência serológica de infecção presente ou passada pelo VHB. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), aproximadamente 350 milhões (5% da população mundial) estão cronicamente infectados e cerca de 600 mil morrem por ano de hepatite B aguda, de cirrose, ou carcinoma hepatocelular (CHC) (OMS, 2008). Esta doença afecta o dobro das pessoas quando comparada com a hepatite C e sete vezes mais quando comparada com Síndrome de Imunodeficiência Adquirida (SIDA). O VHB é cem vezes mais infeccioso do que o Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH) (Ulmer, 2007).

A Hepatite B é caracterizada por uma infecção inicial aguda que pode surgir acompanhada ou não por sintomatologia, que a não evoluir para a cura, prolonga-se e progride para a hepatite crónica. Admite-se que a infecção evolui para a cura em 90 a 95% dos casos e para o estado de portador crónico nos restantes 5 a 10% (Ferreira, 2000; Fonseca, 2007). O risco de progressão para o estado crónico da doença está relacionado com vários factores, nomeadamente a idade (Ferreira and Borges, 2007), sendo de 5 a 10% quando a doença é adquirida num estado adulto, aproximadamente 30% em crianças de 1 a 3 anos e de 90% em bebés com infecção perinatal (Méndez et al., 2007).

Após o período de incubação (intervalo entre a exposição e o aparecimento de sinais ou sintomas da doença) de 45 a 180 dias surge uma fase de infecção aguda que pode prolongar-se por mais de 6 meses (Ferreira, 2000). Quando presentes, os sintomas ocorrem de 1 a 3 meses após a infecção. A maioria dos adultos com boa função imunitária consegue eliminar o vírus da circulação e desenvolver imunidade específica em 6 meses. Para além da doença aguda, há uma proporção significativa de doentes em que o vírus permanece em circulação por mais de 6 meses correspondendo à infecção contínua e prolongada – hepatite B crónica. Estes doentes podem apresentar diferentes manifestações clínicas (geralmente assintomáticos) e apresentam níveis de cargas víricas que variam com o tempo de evolução. São doentes que possuem um elevado

risco de evoluírem para os estados mais graves da doença como a cirrose e o CHC (Fonseca, 2007). Segundo a OMS o CHC é o sexto cancro mais comum e representa a terceira causa de morte por cancro no mundo. A hepatite B crónica é a principal causa de CHC, sendo responsável por 50% dos casos em todo o mundo e de aproximadamente 80% dos casos nas regiões onde a endemicidade do VHB é alta (Hwang and Cheung, 2011).

A transmissão do VHB acontece fundamentalmente pelas vias sexual, perinatal e parentérica. A via sexual representa a principal forma de transmissão dos países de endemicidade intermédia ou baixa. A transmissão perinatal ocorre de forma vertical de mãe para filho e é característica das áreas de endemicidade alta. O rigoroso controlo existente na maioria dos Bancos de Sangue, praticamente eliminou de algumas áreas geográficas a transmissão transfusional e actualmente a transmissão por via parentérica ou percutânea ocorre essencialmente nos toxicodependentes, em profissionais que manipulem produtos biológicos, designadamente profissionais de saúde e raramente através de realização de tatuagens, acupunctura ou tratamentos dentários (Mahoney, 1999; Ferreira, 2000; Méndez et al., 2007).

1.2 – EPIDEMIOLOGIA DA HEPATITE B

O carácter endémico da infecção pelo VHB varia consideravelmente em todo o mundo. O antígeno de superfície (AgHBs) é o marcador serológico utilizado para determinar a prevalência da hepatite B (Figura 1). A endemicidade da infecção é considerada alta, intermédia ou baixa se a prevalência do marcador AgHbs se encontra superior a 8%, entre 2 a 7% ou inferior a 2% respectivamente (Ferreira, 2000).

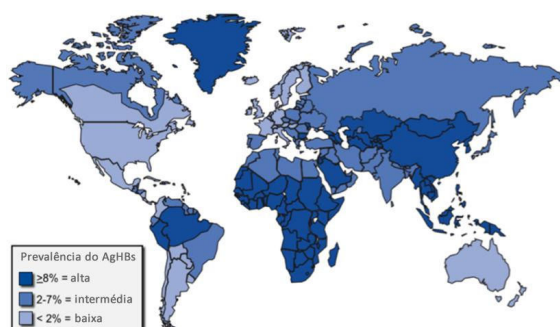


Figura 1. Prevalência da infecção pelo VHB no mundo

Fonte: <http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/en/> (modificado)

Cerca de 45% da população mundial vive em áreas altamente endémicas, normalmente são regiões em desenvolvimento com grande população como o Sudoeste Asiático, China, Bacia Amazónica e África subsaariana. Aproximadamente 12% da população mundial vive em áreas de baixa endemicidade, consideradas regiões desenvolvidas como os Estados Unidos da América, Norte da Europa, Europa Ocidental e Austrália. A restante população ocupa as áreas de endemicidade intermediária, como o Leste e Sul da Europa, Japão, América Central e América do Sul (Hou et al., 2005; Cao, 2009; Hwang and Cheung, 2011).

Segundo o relatório epidemiológico anual de 2010 das doenças transmissíveis na Europa, elaborado pela ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) a taxa de casos de hepatite B declarados em 2008 foi de 1,29 por 100 000 habitantes. A maior incidência do VHB verifica-se no grupo etário dos 25 - 44 anos, com 46% dos casos (2,3 casos por 100 000 habitantes), seguido do grupo etário de 15 - 24 anos (2,02 casos por 100 000 habitantes). A infecção é mais comum no sexo masculino (1,88 casos por 100 000) do que no sexo feminino (0,85 por 100 000). As maiores taxas de notificação foram observadas na Bulgária, Letónia, Luxemburgo e Estónia. Este relatório refere ainda que a Hepatite B diminuiu 8% em 2007 comparado com 2006, e 13% em 2008 quando comparado com 2007. A tendência decrescente foi especialmente evidente na Áustria, Bélgica, Bulgária, Alemanha, Itália, Polónia e Roménia. Em contraste, uma tendência crescente do vírus da hepatite B durante os três anos de estudo (2006 a 2008) foi observada na Finlândia e na Espanha (ECDC, 2010).

Em Portugal desconhece-se com precisão a prevalência da Hepatite B, no entanto, é considerado um país de endemicidade baixa a intermédia. Um estudo realizado em 1984 por Lecour et al., em Portugal concluiu que a prevalência para a hepatite B era relativamente baixa (1,25%). Mais tarde, em 2000, Santos et al., num estudo efectuado na população do distrito de Coimbra refere uma prevalência da hepatite B de 0,9%. Os dois estudos sugerem a existência de 100 a 120 mil portadores crónicos do VHB em Portugal. Estudos efectuados em grupos específicos apresentam resultados muito variáveis. Num estudo realizado em doadores de sangue do Centro Regional de Sangue do Porto (CRSP) entre 2000 e 2005 foi observada uma prevalência do AgHBs a variar entre 0,13% no primeiro ano do estudo e 0,05% no último ano do estudo (Carvalho et al., 2006). Posteriormente a avaliação dos resultados dos marcadores serológicos e moleculares do VHB dos doadores do CRSP foi alargada até 2008 e observa-se que a

prevalência do AgHBs diminuiu ainda mais (0,03%) em 2008 (Queirós et al., 2010). A prevalência do AgHBs verificada num estudo efectuado num estabelecimento prisional foi de 3% mas 40% dos reclusos estudados apresentaram evidências serológicas de contacto prévio com o VHB (Passadouro, 2004). Num grupo de grávidas estudadas em 2000, na Maternidade de Júlio Dinis, a prevalência da infecção pelo VHB observada foi de 2,4% (Lima et al., 2000).

Segundo os dados da Direcção Geral de Saúde (DGS), verifica-se que o número de casos de hepatite B notificados tem vindo a diminuir consideravelmente desde 1993 como pode ser observado na Figura 2. A prevalência do VHB em Portugal segue a tendência do que se passa na maioria dos países do mundo que para além de outras medidas preventivas, recorreram à vacinação como principal forma de controlo da doença.

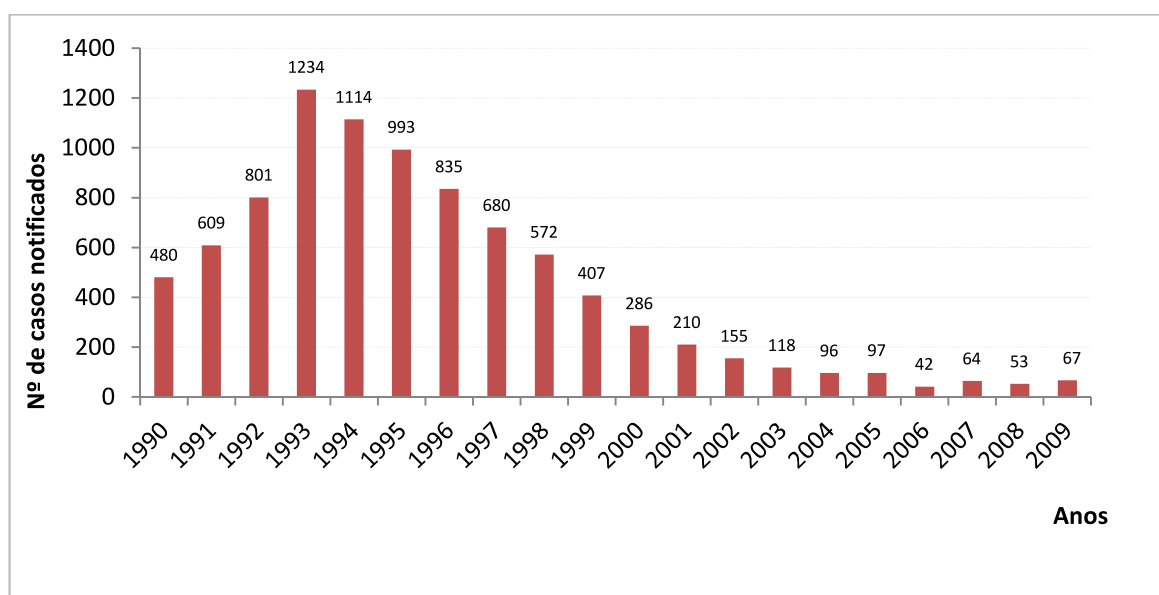


Figura 2. Número de casos de hepatite B notificados à Direcção Geral de Saúde por anos

Fonte: http://www.pordata.pt/azap_runtime/?n=4 (modificado)

1.3 – VÍRUS DA HEPATITE B

1.3.1 - CARACTERIZAÇÃO DO VHB

O VHB pertence à família dos hepadnavírus, cuja partícula vírica infecciosa (virião ou partícula de Dane) é esférica, constituída por duas estruturas e possui 42 nm de diâmetro. A estrutura externa designada por envólucro externo ou antígeno de superfície (AgHBs) é composta por uma bicamada lipídica, proteínas e glicoproteínas: grande L (Large), média M (Middle) e pequena S (Small). A estrutura interna ou core é ligeiramente hexagonal e é conhecido pelo antígeno do core (AgHBc). Protegido por esta estrutura encontra-se o material genético do tipo ADN (ácido desoxirribonucleico) associado à enzima polimerase/ transcriptase reversa (rt). Com um comprimento de 3200 pares de bases (pb), é considerado o genoma mais pequeno dos vírus que infectam os humanos (Figura 3) (Soriano and González-Lahoz, 2008).

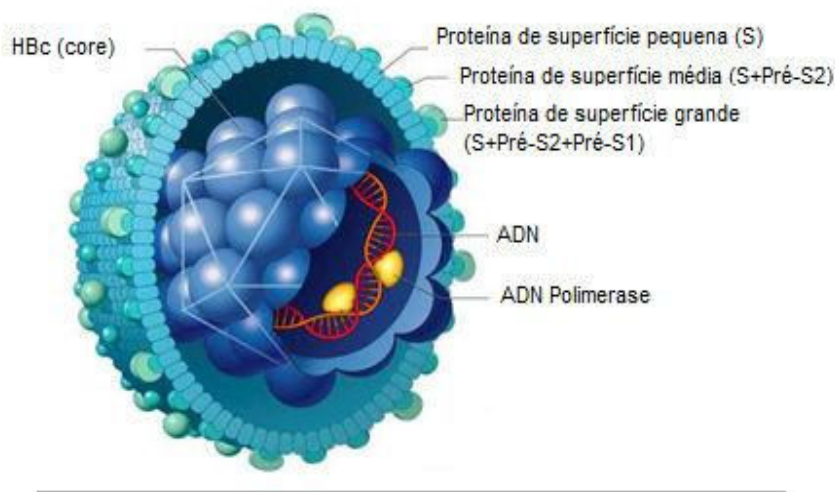


Figura 3. Esquema representativo da estrutura do VHB

Fonte: <http://www.rit.edu/~japfaa/infectious.html> (modificado)

No soro de indivíduos infectados pelo VHB, podem encontrar-se partículas não infecciosas que são estruturas incompletas que não possuem ADN vírico, constituídas principalmente pelo AgHbs. Estas partículas podem apresentar formas tubulares ou esféricas mas com 22 nm aproximadamente, de diâmetro (Mahoney, 1999).

A molécula de ADN é circular de dupla cadeia: uma completa (cadeia -) e outra parcialmente incompleta (cadeia +). A cadeia completa é complementar ao ARN (ácido ribonucleico) mensageiro e contém cerca de 3200 pb que estão organizados em quatro regiões de leitura aberta (ORF- *Open Reading Frame*) que codificam 7 proteínas estruturais (Figura 2) (Valsamakis, 2007).

- Gene préS/S (superfície) codifica as glicoproteínas L, M e S do invólucro do vírus (AgHBs), todas presentes nas partículas víricas infecciosas.
- Gene préC/C (core) codifica uma proteína solúvel (AgHBe) e a proteína da nucleocápside (AgHBc) respectivamente.
- Gene P (polimerase) codifica a ADN polimerase com actividade de transcriptase reversa
- Gene X codifica uma proteína reguladora da expressão genética vírica e celular.

A Figura 4, representa a organização do genoma onde é possível observar a sobreposição dos genes que codificam as proteínas estruturais (AgHBs e AgHBc), as proteínas não estruturais que não fazem parte da partícula infecciosa (AgHBe) e as proteínas replicativas (ADN polimerase e proteína X). O gene de superfície está completamente sobreposto ao gene da polimerase. O gene de polimerase compreende cerca de 75% da extensão do genoma e produz uma proteína multifuncional que inclui: uma proteína terminal, uma região “*spacer*” ou de ligação, uma região da polimerase/transcriptase reversa do ADN e uma região correspondente à ribonuclease H (Seeger and Mason, 2000).

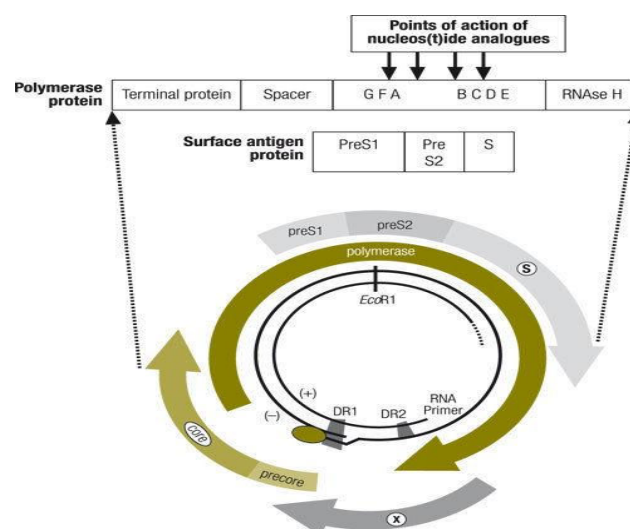


Figura 4. Estrutura e organização do genoma do vírus da hepatite B (Clements et al., 2010).

1.3.2 - REPLICAÇÃO E CICLO DE VIDA DO VHB

A replicação vírica do VHB ocorre nos hepatócitos (vírus hepatotrópicos). O ciclo de replicação do VHB (Figura 5) inicia-se com a ligação do virião ao hepatócito, mediada pela glicoproteína de superfície préS1 e um receptor do hepatócito. Dentro do hepatócito, a bicamada lipídica funde-se com a membrana celular libertando o core no citoplasma que se dirige de seguida para o núcleo. O genoma do VHB é então libertado dentro do núcleo, onde se completa a síntese da cadeia positiva (incompleta) do ADN. O genoma vírico é, assim, convertido pela ADN polimerase numa cadeia de ADN circular covalentemente fechada (*covalently closed circular DNA* – cccDNA). O cccDNA é um intermediário estável e responsável pela persistência do vírus e é muito resistente à terapia antivírica, razão que explica não só a dificuldade para eliminar por completo o VHB durante o tratamento como o rápido aumento da carga vírica após suspensão do tratamento (Soriano and González-Lahoz, 2008).

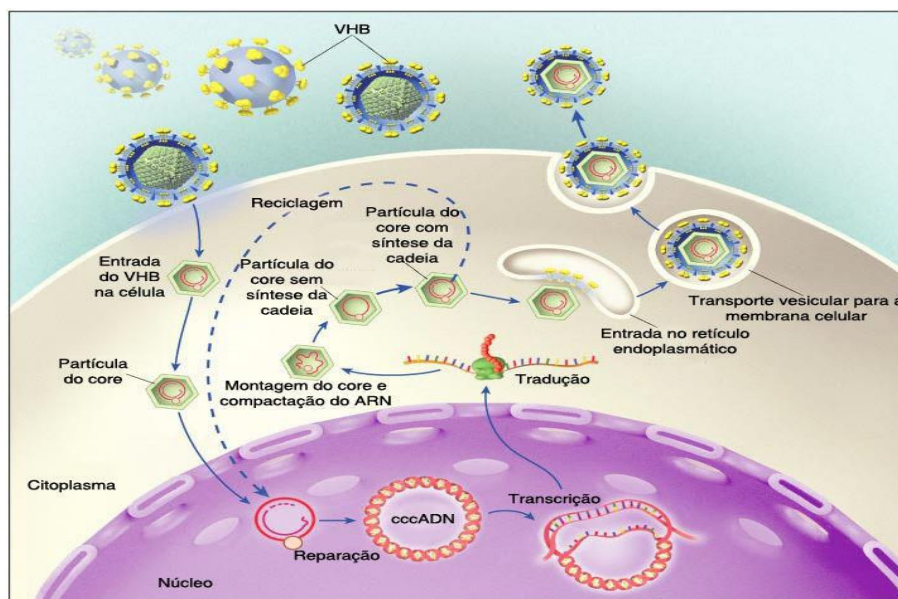


Figura 5. Representação do ciclo replicativo VHB

Fonte: http://www.infekt.ch/updown/images/hbv_cycl.gif (modificado)

O cccDNA funciona como modelo dando origem ao ARN mensageiro (ARNm) para a síntese das proteínas víricas e ao ARN pré-genômico para a síntese do genoma vírico. O ARN pré-genômico é transportado para o citoplasma, incorporado na nucleocápside e convertido na cadeia negativa do ADN pela transcriptase reversa. A síntese da cadeia positiva é então iniciada e as partículas do core, contendo ADN vírico, são então

envolvidas por AgHBs e secretadas para fora do hepatócito ou transportadas para o núcleo, onde se completa a síntese da cadeia positiva e se forma novamente o cccDNA. Há assim, 2 fontes de cccDNA: as novas partículas víricas que entram no hepatócito e a translocação para o núcleo do ADN do VHB sintetizado de novo no citoplasma do hepatócito. O ADN do VHB não se integra no genoma do hospedeiro durante o curso normal da replicação (Mahoney, 1999).

1.3.3 - VARIABILIDADE GENÉTICA DO VHB

A variabilidade genética do VHB é explicada pelo número elevado de cópias víricas produzidas durante a replicação activa e pela falta de actividade de reparação da polimerase do VHB, resultando numa taxa elevada de mutações (Gunther, 2006; Sheldon, 2006).

A probabilidade de encontrar mutações no VHB é maior que nos vírus da Imunodeficiência Humana (VIH) e vírus da Hepatite C (VHC) uma vez que a taxa de produção de viriões do VHB é consideravelmente superior à dos VIH e VHC e aproximadamente 10 vezes superior aos outros vírus de ADN. As estimativas são da ordem de 10^{11} viriões por dia (Stuyver et al., 2001; Sheldon et al., 2006). A taxa de erro da polimerase do VHB foi calculada como 10^{10} pares de bases por dia (Wagner et al., 2004). A semi-vida do VHB no plasma varia entre 1 a 3 dias, mas no hepatócito é 10-100 dias (Sheldon et al. 2006).

1.3.3.1 – SUBTIPOS

A primeira indicação para a heterogeneidade das sequências do VHB é a existência de diferentes determinantes antigénicas do AgHBs que levaram à classificação do VHB em quatro principais subtipos serológicos: *adw*, *adr*, *ayw* e *ayr* identificados por Le Bouvier e Bancroft et al. no início da década de 70 (Lindh et al., 1998; Gunther, 2006; Méndez et al., 2007).

Por técnicas de imunodifusão foi possível mostrar que o invólucro externo do VHB continha um epítipo presente em todos os subtipos, denominando de determinante comum “a”. Os subtipos resultantes apresentavam então um epítipo constante “a” e dois epítopos variáveis ou subdeterminantes “d” ou “y” e “w” ou “r” (Fonseca, 2007)

Em 1983, Courocé-Pauty et al. com a realização de um grande estudo envolvendo um grande número de amostras de doentes crónicos de vários países identificaram 9 subtipos serológicos do AgHbs do VHB (Lindh et al., 1998). As técnicas de biologia molecular vieram esclarecer que os subtipos são especificados por mutações pontuais no gene S, nos aminoácidos na posição 122 (lisina para arginina) para os subtipos “d” ou “y” e na posição 160 “w” ou “r” (Tabela 1) (Wagner et al., 2004).

Tabela 1. Aminoácidos que especificam os subtipos do AgHBs do VHB.

Posição 122	Posição 160	
	Lisina (“w”)	Arginina (“r”)
Lisina (“d”)	dw	dr
Arginina (“y”)	yw	yr

Estes subtipos têm diferente distribuição geográfica sendo úteis como marcadores epidemiológicos. A determinante “a” é comum a todos estes subtipos e é o alvo para o anticorpo neutralizante anti-HBs. A infecção por um dado subtipo exerce protecção cruzada em relação aos outros, pelo que, a coinfeção com mais do que um subtipo do VHB é rara (Khoury and Santos, 2004).

1.3.3.2 - GENÓTIPOS

As metodologias de sequenciação do genoma permitiram observar uma divergência na sequência genómica completa do VHB de mais de 8%. Durante as últimas duas décadas, com base na semelhança das sequências, o VHB foi caracterizado em 8 genótipos, classificados de A a H (Méndez et al., 2007; Almeida, 2009). Recentemente surge a proposta de mais dois genótipos designados provisoriamente por I e J. O genótipo I foi evidenciado em doentes do Vietnam, Laos, Índia e Noroeste da China, mas questiona-se a possibilidade de ser uma recombinação de genótipos. O genótipo J foi observado num paciente do Japão (Cao, 2009; Dény and Zoulim, 2010).

Os genótipos são então definidos por uma divergência $\geq 8\%$ da sequência nucleotídica do genoma completo do VHB e $\geq 4\%$ da sequência do gene de superfície (pre-S1, preS2 e S) (Stuyver et al., 2001; Wagner et al., 2004).

Os genótipos apresentam genomas com diferentes comprimentos (Tabela 2). Os genomas B, C, F e H têm 3215 nucleótidos (nt) de comprimento. O genótipo D apresenta uma deleção de 33 nt na região PréS1 (região “*spacer*” do gene da polimerase) possuindo apenas 3182 nt de comprimento. Os genótipos E e G apresentam uma deleção de 3 nt na mesma região da polimerase. O genótipo A varia dos outros genótipos pela inserção de 6 nt na região terminal da proteína do gene da polimerase, na sobreposição com o gene core. O genótipo G apresenta o genoma maior (3248 nt) devido à inserção de 36 nt no terminal-N do gene core. Outra característica do genótipo G é a presença de um codão stop na região pré-C nos codões 2 e 28 que impedem a síntese de AgHBe (Stuyver et al., 2001; Bartholomeusz and Schaefer, 2004; Gunther, 2006).

Tabela 2. Genótipos do VHB (adaptado Stuyver et al., 2001).

Genótipo	Genoma (nt)	Antigénio de superfície (aa)	Polimerase (aa)	Antigénio do core (aa)	Distribuição geográfica
A	3221	400	845	185	Norte da Europa, América do Norte, África subsariana, Índia
B	3215	400	843	183	Sudoeste da Ásia, China, Japão
C	3215	400	843	183	Sudoeste da Ásia, China, Japão, Coreia, Polinésia
D	3182	389	832	183	Base mediterrânea (Portugal, Espanha, Itália) Médio Oriente, Índia, Rússia, E.U.A
E	3212	399	842	183	África Central
F	3215	400	843	183	América do Sul, América Central
G	3248	399	842	195	Alemanha, França, E.U.A.
H	3215	400	843	183	América do Sul, América Central

Os Genótipos apresentam uma distribuição geográfica variável (Figura 4). O genótipo A é mais encontrado na América do Norte, no Norte da Europa, na Índia e na África, o genótipo B e C na Ásia, o genótipo D no sul da Europa, África, Médio Oriente e Índia. O genótipo E no Oeste e Sul de África, o genótipo F na América Central e América Latina, sendo o mais frequente na população indígena. O genótipo G nos Estados Unidos, França e Alemanha e o genótipo H na América Central e Califórnia (Bartholomeusz and Schaefer, 2004; Aljarallah, 2006; Almeida, 2009).

Extensas análises filogenéticas mostraram que os genótipos do VHB podem ser subdivididos em pelo menos 34 subgenótipos designados por números: de 1-5 para o genótipo A, 1-8 para o genótipo B, 1-9 para o genótipo C e 1-7 para genótipo D e 1-5 para o genótipo F. Não estão descritos subgenótipos para os genótipos E, G e H (Schaefer, 2007; Cao, 2009).

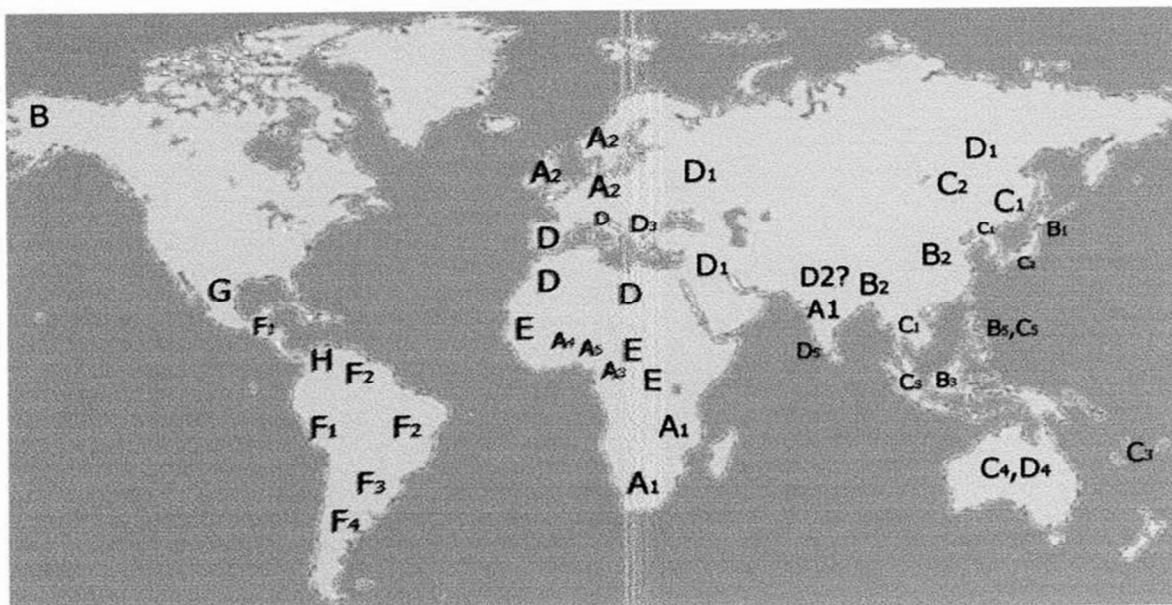


Figura 6. Distribuição geográfica dos genótipos e subgenótipos do VHB (Schaefer, 2007).

A distribuição geográfica dos genótipos pode mudar devido à migração da população humana ou devido a comportamentos de risco específicos. Os pacientes podem ser co-infectados com genótipos diferentes, por exemplo G + A ou A + D, e o genótipo predominante pode mudar durante a infecção (Gunther, 2006). A co-infecção de genótipo levanta a possibilidade de recombinação entre genótipos (Wagner et al., 2004; Gunther, 2006).

A associação dos genótipos do VHB com a evolução clínica tem sido mais intensamente estudada em populações onde a prevalência da doença é alta (Valsamakis, 2007). Os genótipos B e C têm sido extensivamente estudados devido à sua co-circulação na Ásia, eliminando as diferenças na origem étnica ou racial dos pacientes. Estes estudos mostram que o genótipo B, em comparação com o genótipo C, está associado a uma maior taxa de seroconversão do antígeno “e” do VHB (AgHBe) para anticorpo contra Ag HBe (anti-HBe), doença hepática menos activa, e uma menor taxa de progressão para cirrose (Lindh et al., 1998). Do mesmo modo, o genótipo C é mais prevalente entre

pacientes com antígeno do AgHBe-positivos do que o genótipo B (Orito et al., 2001) e está associado a doentes com manifestações mais graves da doença como cirrose e CHC (Yin et al., 2010). Na Índia, estudos realizados em doentes crónicos onde predominam os genótipos A e D verificaram que o genótipo A do VHB está mais frequentemente associado a doentes que apresentam níveis elevados de aminotransferases (ALT), positividade para o AgHBe e ausência de anti-Hbe do que os que são do genótipo D. A associação com a cirrose no fígado, em idades jovens (25 anos), também se verificou sendo igualmente mais frequente nos doentes com genótipo A do que D (Kumar et al., 2005; Datta, 2008). Mota e colaboradores verificaram que os valores elevados das cargas víricas estavam associados de forma significativa e independente com o genótipo D (Mota et al., 2009). Um estudo realizado em Itália em 2007 sugere especial vigilância para as mutações de escape à vacina nas populações com alta frequência de infecção com o genótipo D uma vez que verificaram a presença da mutação para o codão 145 (mutação da determinante “a” do antígeno de superfície) em 58,2% dos doentes com este genótipo (Maddalena et al., 2007).

Em relação à terapêutica existem estudos que referem melhor resposta ao tratamento com Interferão nos pacientes com genótipo A e B comparados com o genótipo D e C (Kao et al., 2000; Cao, 2009).

1.3.4 – MUTAÇÕES NO GENOMA DO VHB

Nas últimas décadas, as mutações do VHB representam um factor importante a considerar durante o diagnóstico da doença. Desde os anos 80 que se tem verificado o aparecimento de mutações em todo o genoma do VHB sempre que o vírus reage a pressões selectivas, como a vacinação e à terapia antivírica. A adaptação vírica através da mutação vai continuar, com a introdução de novas opções de tratamento e com a expansão das opções actuais nas áreas endémicas da infecção. O aparecimento de mutantes do VHB pode alterar os actuais algoritmos de diagnóstico e tratamento (Coleman, 2006).

1.3.4.1 - MUTAÇÕES NA REGIÃO S

Actualmente, são encontradas mutações nas regiões Pré-S1, Pré-S2 e S, que ocorrem principalmente em portadores crónicos do VHB. A mutação mais frequente é a G145R reconhecida pela troca da glicina por arginina no codão 145 da determinante “a” (região altamente conservada entre os vários subtipos do VHB) que inibe a expressão do AgHBs. Esta mutação é estável e foi considerada uma mutação de escape à vacinação em que aproximadamente 5% dos vacinados não desenvolveram uma resposta anti-HBs adequada (Carman et al., 1990). A existência de mutações na região S possibilita a não detecção do AgHBs por métodos serológicos que a não serem realizados testes moleculares de detecção e ou quantificação de ADN-VHB aumenta-se o risco de transmissão de infecção por transfusão sanguínea (Coleman, 2006).

1.3.4.2 – MUTAÇÕES NA REGIÃO PRÉ-CORE E CORE

Na região pré-core estão descritas mutações, geralmente pontuais por substituição de um único nucleótido (nt), 1762 (A por T), 1764 (G por A), 1835 (A por C) e 1899 (G por A) que produzem um codão “stop” e reduzem a expressão do AgHBe. A mais comum é a que ocorre no codão 28 (G1896A) resultando mesmo na interrupção do AgHBe, característica dos pacientes crónico AgHBe negativos (LoK, 2000).

1.3.4.3 – MUTAÇÕES NA REGIÃO X

Delecções verificadas na região X estão normalmente associadas à diminuição de expressão do AgHBs podendo pôr em causa a sua detecção nos testes serológicos ou até por técnicas moleculares se as técnicas forem direccionadas para a região onde se verificou a delecção (Poordad and Chee, 2010).

1.3.4.4 - MUTAÇÕES NA REGIÃO P

As mutações verificadas na região da polimerase, basicamente estão relacionadas com o tratamento com antivíricos. A lamivudina é o fármaco ao qual mais se associa a existência de mutações que conferem resistência antivírica, e a probabilidade de aparecimento de resistência aumenta com o uso prolongado da terapêutica (Kessler et al., 2003). Normalmente os vírus resistentes à lamivudina apresentam alterações no domínio catalítico “YMDD” do gene da polimerase (Torresi, 2002).

1.4 – DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico de qualquer uma das formas clínicas da hepatite B realiza-se através de técnicas serológicas e moleculares. Os marcadores serológicos são de extrema importância não só no diagnóstico como também no acompanhamento da infecção vírica e na avaliação do estado clínico. As técnicas moleculares foram progressivamente introduzidas na rotina laboratorial permitindo complementar os resultados obtidos por técnicas serológicas relativamente à detecção e quantificação da carga vírica, índice de replicação e eficácia da terapêutica (Ferreira, 2000).

Marcadores serológicos de diagnóstico do vírus da hepatite B:

Antigénio de superfície (AgHBs): primeiro marcador serológico a surgir no decurso da infecção. Quando presente por mais de 6 meses, define a infecção crónica.

Anticorpo de superfície (AcHBs ou anti-HBs): a presença isolada indica imunidade (por vacina); associado a outros marcadores, representa infecção antiga com recuperação imunitária.

Antigénio “e” do VHB (AgHBe): indica replicação activa do vírus, mas a sua ausência não significa o contrário. Na hepatite AgHBe negativa, a não detecção não reflecte nem ausência, nem benignidade da infecção.

Anticorpo “e” do VHB (AcHBe ou anti-HBe): pode significar seroconversão, isto é, ao associar-se à perda de AgHBe. Esta seroconversão no sistema “e” é um aspecto importante nos casos submetidos a terapêutica antivírica, porque geralmente corresponde à viragem na replicação vírica, de níveis altos replicativos para níveis exíguos. No entanto, na hepatite crónica AgHBe negativa, o anti-HBe é o marcador visível deste tipo de infecção e não está relacionado com o nível (alto ou baixo) de carga vírica.

Antigénio do core (AgHBc): detectado apenas no tecido hepático; útil apenas em certas situações clínicas.

Anticorpo do core (AcHBc ou anti-Hbc): a presença deste anticorpo indica exposição prévia ao vírus B.

A presença de ADN do VHB em circulação constitui um indicador de que o vírus está activo, sendo a quantidade de ADN do VHB em circulação, uma medida da capacidade replicativa do vírus. Os níveis de ADN-VHB são variáveis nas diferentes fases da infecção no mesmo indivíduo e são critério fundamental para a decisão e monitorização

da terapêutica. Os níveis mais elevados de ADN-VHB estão, geralmente, associados à lesão hepática e degradação da sua função, na maioria dos doentes. Os testes mais sensíveis utilizam tecnologia de amplificação enzimática (Polymerase Chain Reaction, PCR) e são estes que habitualmente são empregues para as decisões clínicas mais importantes no contexto da infecção crónica. O ADN do VHB pode ser detectado entre 6 a 12 semanas após exposição do vírus ou mesmo antes se são utilizados métodos baseados na PCR (Sablon and Shapiro, 2005). O ADN do VHB é o único marcador que permite identificar a Infecção Oculta do Vírus da Hepatite B (IOB) (Fonseca, 2007).

A alanina aminotransferase (ALT) ou alanina transaminase é uma enzima libertada para a corrente sanguínea a partir dos hepatócitos lesionados. Os níveis de ALT são elevados nas formas agudas da doença, que embora possam ser assintomáticas, caracterizam-se por necrose acentuada dos hepatócitos. Na hepatite B crónica os níveis de ALT estão geralmente pouco elevados a normais (Ferreira, 2000).

A sequenciação do genoma completo ou parcial (regiões dos genes pré-S e S) têm sido utilizadas para determinar os genótipos do VHB (Denis et al., 2004; Guirgis et al., 2010). Outras metodologias de identificação molecular têm sido descritas entre as quais: a análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição (RFLP- *Restriction Fragment Length Polymorphism*) do ADN -VHB amplificado por PCR, a hibridização em membrana após a PCR, PCR com “*primers*” específicos para os diferentes genótipos, PCR multiplex, Chips “*Microarray*” oligonucleotídeos e testes sorológicos específicos (tipo ELISA) (Vernet, 2004; Valsamakis, 2007).

1.5 - TRATAMENTO DOS DOENTES CRÓNICOS

O principal objectivo do tratamento da hepatite B é suprimir a replicação vírica antes que ocorra lesões irreversíveis no fígado. A terapêutica antivírica existente permite alcançar o objectivo de três formas diferentes (Ferreira, 2000; Lok and McMahon, 2007):

- supressão da replicação do VHB (demonstrada por ADN-VHB indetectável no soro/plasma; seroconversão do AgHBe para anti-HBe; seroconversão do AgHBs para antiHBs).

- remissão total ou parcial da doença hepática (demonstrada pela normalização das aminotransferases no soro, supressão da actividade necroinflamatória à biopsia hepática).
- diminuição do risco de desenvolvimento tardio de cirrose hepática e HCH, com consequente aumento de sobrevida e qualidade de vida dos doentes infectados.

A infecção pelo VHB não pode ser completamente erradicada devido à persistência de ADN circular covalentemente fechado (cccDNA) no núcleo dos hepatócitos infectados (Ferreira and Borges, 2007).

A terapêutica deve reduzir os níveis de carga víricos (ADN-VHB) para um nível tão baixo quanto possível, preferencialmente abaixo do limite inferior de detecção de PCR em tempo real, para assegurar um grau de supressão virológica que vai então levar a remissão bioquímica, melhoria histológica e prevenção das complicações (Lok and McMahon, 2007).

As indicações para o tratamento são geralmente as mesmas tanto para doentes com Hepatite B crónica, AgHBe-positivo como AgHBe-negativo. São baseadas principalmente na combinação de três critérios:

- níveis séricos de ADN-VHB
- níveis séricos de aminotransferase (ALT).
- grau e estado histológico

As indicações para o tratamento também devem ter em conta a idade, o estado de saúde do doente e a disponibilidade de fármacos antivirais nos diferentes países (EASL, 2009).

Segundo a EASL (European Association for the Study of the Liver) os fármacos disponíveis para o tratamento da hepatite B crónica são: interferão alfa convencional, interferão alfa peguilado e os análogos dos nucleosídeos/nucleotídeos (EASL, 2009). Os análogos dos nucleosídeos/nucleotídeos utilizados na terapia do VHB pertencem a três categorias estruturais: análogos L-nucleosídeos (lamivudina, telbivudina e emtricitabina), análogos desoxiguanosina (entecavir) e nucleosídeos acíclicos fosfonatos (adefovir e tenofovir). Lamivudina, adefovir, entecavir, a telbivudina e tenofovir foram aprovados na Europa para tratamento do VHB (EASL, 2009).

O interferão α (IFN α) foi o primeiro fármaco aprovado e possui actividade antivírica, antiproliferativa e imunomoduladora. O interferão α peguado (pegIFN α) é uma modificação do interferão α convencional e resulta da união de uma molécula de polietilenoglicol (peg) à sua estrutura. Esta modificação diminui a eliminação renal aumentando a vida média do fármaco possibilitando a administração deste apenas uma vez por semana (Valderrama et al., 2007). A principal vantagem do IFN α (convencional ou peguado) é a ausência de resistência, apresenta contudo, como desvantagens a forma de administração (injectável) e os efeitos secundários (Dény and Zoulim, 2010).

A lamivudina (LMV) é um análogo de nucleosídeos, apresenta uma acção potente contra a transcriptase reversa, inibindo a síntese de ADN-VHB a partir do ARN pré-genómico, bloqueando a síntese de novas partículas virais. A maior limitação resultante do tratamento prolongado com lamivudina é o desenvolvimento de resistência por mutações na polimerase do VHB. A mutação mais comum é a que ocorre no locus YMDD (tirosina-metionina-aspartato-aspartato), localizado na região da transcriptase reversa (rt) do gene da polimerase, resultante da substituição da metionina por valina ou isoleucina na posição rt204 (rtM204V/I). Esta mutação normalmente é acompanhada pela mutação que ocorre com a substituição da leucina por metionina na posição rt180 (rtL180M) (Bartholomeusz and Locarnini, 2006). O desenvolvimento de resistências deve ser suspeitado quando durante o período de administração do farmaco o ADN-VHB reaparece e as aminotransferases voltam a aumentar (Lok and McMahon, 2007).

O adefovir (ADV) dipivoxil é um análogo de nucleotídeo de adenosina monofosfato que inibe tanto a transcriptase reversa como a actividade da polimerase de ADN. Incorpora-se dentro da cadeia de ADN do VHB causando a sua interrupção. Tem-se revelado como um potente inibidor da replicação do VHB, reduzindo significativamente os níveis de ADN-VHB séricos e promovendo a seroconversão do AgHbe para anti-HBe em larga proporção de doentes tratados. Porém, têm sido descritas mutações rtN236T e rtA181V/T (Poordad and Chee, 2010).

O entecavir (ETV) é um análogo carbocíclico da 2'-deoxiguanosina que inibe a replicação do VHB. Pode ocorrer mutação rtM204V e rtL180M ou mutações pontuais em qualquer posição 169, 184, 202 ou 250 da rt. Estas últimas quando se apresentam isoladas não têm implicações na susceptibilidade do ETV, mas se surgem associadas a mutações de resistência à LVD diminuem a actividade do ETV (Lok and McMahon, 2007).

A telvudina (LdT) é um análogo L nucleosídeo com potente actividade contra o VHB, contudo, apresenta também como limitação, a indução de resistência. A mutação rtM204I que confere resistência à LdT é menos frequente que para a LVD mas desenvolve-se rapidamente (Poordad and Chee, 2010).

O Tenofovir (TDF) é um análogo nucleotídeo com uma acção semelhante ao adefovir (EASL 2009). Ainda não foram referidas resistências para este fármaco (Poordad and Chee, 2010).

O TDF e o ETV são antivíricos caracterizados por um efeito anti-VHB muito potente. A probabilidade de desenvolverem resistências é nula ou quase nula. De acordo com as últimas linhas de orientação da EASL, são os dois antivíricos a ser usados como primeira linha terapêutica, em monoterapia (EASL, 2009).

A maioria das mutações que conferem resistência aos fármacos anteriormente mencionadas ocorre na região da transcriptase reversa (rt) do gene da polimerase do VHB. A região rt possui 344 aminoácidos (aa) de comprimento e tem 7 domínios conservados denominados de A a G (Figura 7). Nestes domínios existem oito codões que estão associados com a resistência aos fármacos (codões 169, 180, 181, 184, 202, 204, 236 e 250) (Tabela 3) (Stuyver et al., 2001; Poordad and Chee, 2010).

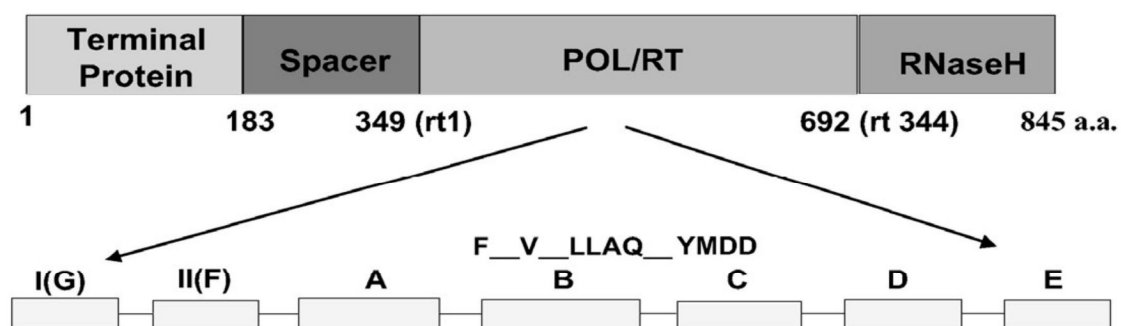


Figura 7. Esquema representativo do gene da polimerase (gene Pol) do VHB (Sablon and Shapiro, 2005).

Tabela 3. Localização das mutações de resistência associadas aos análogos de nucleosídeos /nucleotídeos nos domínios do gene Pol do VHB (Poordad and Chee, 2010).

Fármaco	Domínios da região rt do gene Pol do VHB				
	A	B	C	D	E
Lamivudina	L80I	V173L			
		L180M	M204V/I		
		A181T/V			
Telbivudina		L180M	M204I		
		A181T/V	M204V (quando combinado com L180M)		
Entecavir		L180M	M204V/I		
		T184S/A/I/L/C/G/M	S202C/G/I		M250V/I
		I169T			
Adefovir		A181T/V		N236T	
Tenofovir	Nenhuma mutação assinalada até 144 semanas (3 anos) de tratamento				

O genoma do VHB é circular e está organizado em quatro quadros de leitura aberta, que se sobrepõem uns aos outros. Como consequência, a parte do gene da polimerase que codifica a enzima transcriptase reversa (rt) - o alvo da terapia antivírica – sobrepõe-se ao domínio de neutralização do gene de superfície que codifica a proteína S - o alvo dos anticorpos induzidos pela vacina da Hepatite B. O tratamento dos doentes, com análogos de nucleosídeos resultam em mutações no gene da polimerase, muitas das vezes associadas com alterações na determinante "a" do antígeno de superfície (Bartholomeusz and Locarnini, 2006; Sheldon et al., 2006). As resistências à lamivudina estão descritas como sendo comuns em doentes em monoterapia, passando de 15% após o primeiro ano de tratamento para 67%, quando utilizado continuamente por 4 anos (Clements et al., 2010). Assim sendo, em populações onde a lamivudina tem sido amplamente utilizada para tratar doentes de forma contínua, por períodos de vários anos, é provável que ocorram vírus com alterações no antígeno de superfície com alguma frequência, e que alguns desses, estejam associados a mutações de escape à vacina (Torresi et al., 2002).

2 - OBJECTIVOS

Foi definido como objectivo principal deste trabalho determinar os genótipos do vírus da Hepatite B na população dos doentes com Hepatite B crónica com pedido de estudo no Centro Regional de Sangue do Porto - Instituto Português do Sangue (CRSP-IPS) entre Setembro de 2008 e Dezembro de 2010.

Adicionalmente e como objectivo secundário, determinaram-se também as mutações que conferem resistência aos fármacos actualmente utilizados na terapêutica da Hepatite B.

Este trabalho permite verificar se o genótipo predominante corresponde ao que está descrito na literatura para a nossa localização geográfica e relacionar os resultados da determinação dos genótipos do vírus da Hepatite B com os resultados de estudos semelhantes realizados em Portugal.

Permite também identificar a frequência relativa das mutações mais frequentes.

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - IDENTIFICAÇÃO DA POPULAÇÃO EM ESTUDO E DA AMOSTRA

O estudo foi efectuado em todas as amostras de doentes com Hepatite B crónica enviadas para estudo do genótipo de VHB para o Centro Regional de Sangue do Porto (CRSP) pelos hospitais da zona Norte que possuem protocolo para estudos analíticos por biologia molecular.

Desta população seleccionaram-se para estudo todas as amostras que apresentavam uma carga vírica para o VHB superior a 100 UI/mL.

3.2– METODOLOGIA

3.2.1- AMOSTRAS E CONTROLOS

As amostras enviadas para o CRSP com pedido de estudo de genotipagem do VHB foram recepcionadas no Laboratório de Agentes Transmissíveis - Laboratório de Biologia Molecular. As amostras eram constituídas por alíquotas de plasma em tubos estéreis e hermeticamente fechados, ou amostras de sangue total em tubos contendo anticoagulante EDTA (ou ACD) que posteriormente foram centrifugadas durante 20 minutos a 1500g, à temperatura ambiente e o plasma foi separado para tubos estéreis.

As amostras foram armazenadas a -20°C (por períodos inferiores a um mês), sendo processadas maioritariamente em ensaios de 6 amostras, de acordo com a disponibilidade operacional.

Os controlos, positivo e negativo, utilizados em cada série de testes, foram os recomendados e disponibilizados pelo fabricante SIEMENS® encontrando-se prontos a usar. O controlo positivo é constituído por plasmídeo não infeccioso contendo sequências do VHB com aproximadamente 520 bases com homologia para o genótipo A. O controlo negativo é composto apenas por uma solução tamponada.

3.2.2 – QUANTIFICAÇÃO DO ADN DO VHB

Foi feita a quantificação da carga vírica do ADN-VHB a todas as amostras pelo método de Reacção em Cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real realizado no Cobas AmpliPrep (Extracção dos Ácidos nucleicos do VHB) e Cobas Taqman® (Amplificação e detecção dos ácidos nucleicos do VHB) utilizando o teste Cobas® AmpliPrep/Cobas®

TaqMan® HBV da Roche Diagnostics. O procedimento foi efectuado de acordo com as recomendações do fabricante.

O teste Cobas® AmpliPrep/Cobas® TaqMan® HBV permite a preparação automatizada das amostras através de uma técnica genérica de captura à base de sílica, seguida da amplificação e detecção automatizadas por PCR do ADN alvo para o VHB e do ADN do Padrão de Quantificação (PQ) do VHB. O PQ do VHB é uma estrutura de ADN não infecciosa que contém fragmentos de sequências de VHB com regiões de ligação para o iniciador idênticas às da sequência alvo do VHB, sendo incorporado em cada amostra e submetido a todos os passos do teste.

O reagente de mistura principal contém pares de iniciadores e sondas específicas para o ADN do VHB e para o ADN do PQ. A detecção de ADN amplificado foi efectuada através de uma sonda oligonucleotídica duplamente marcada específica para o alvo e para o PQ, que permitiu a identificação independente do amplicão do VHB e do amplicão do PQ do VHB.

A reacção de amplificação por PCR foi efectuada com uma enzima termoestável recombinante (*Thermus specie Z05 de Polimerase do ADN*).

A utilização de sondas fluorescentes duplamente marcadas permite a detecção em tempo real da acumulação de produtos de PCR, ao monitorizar a intensidade de emissões de corantes sinalizadores fluorescentes libertados durante o processo de amplificação. A amplificação do ADN do VHB e do ADN do PQ do VHB foram determinadas independentemente a diferentes comprimentos de onda.

O resultado da carga vírica foi expresso em Unidades Internacionais por mililitro (UI/mL). O intervalo linear deste teste é de 20 UI/mL a $1,7 \times 10^8$ UI/mL.

3.2.3 - GENOTIPAGEM DO VHB PELO TRUGENE® HBV GENOTYPING

A determinação dos Genótipos do VHB pelo Trugene® HBV Genotyping consiste em seis processos distintos (Tabela 4):

- extracção dos ácidos nucleicos do VHB;
- amplificação, por PCR, dos ácidos nucleicos;
- sequenciação de CLIP® dos produtos amplificados (amplicões);
- desnaturação dos produtos CLIP®;
- eletroforese dos diferentes produtos das reacções de sequenciação CLIP®;
- análise das sequências de CLIP®

Todos os processos foram executados seguindo as indicações do fabricante (Bula nº 10469332 Ver.A, 2008-06), excepto o processo da extracção dos ácidos nucleicos. O

teste MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation, da Roche Diagnostics, foi o teste de extracção utilizado por ser um teste já implementado e validado, em utilização na rotina do laboratório.

Tabela 4. Resumo dos Processos envolvidos na determinação dos Genótipos do VHB pelo Trugene[®] HBV Genotyping.

Preparação da amostra	Extracção do ADN	MagNa Pure (Roche)
Reacção de PCR	↓ PCR	1200 pb
Reacção de Sequenciação	↓ Reacção de Sequenciação	CLIP [™] (520 pb)
Detecção	↓ Long-ReadTower [™]	GeneObjects 4.0
↓	GeneObjects [™]	
Análise	GeneObjects [™] /GeneLibrarian [™]	Genótipos (A-G) Mutações

Os diferentes processos deste teste foram executados em diferentes áreas laboratoriais, também de acordo com as recomendações do fabricante, nomeadamente:

Área 1 - extracção de ADN - alvo a partir de amostras de plasma

Área 2 - preparação de reagentes nomeadamente as misturas de reacção “*Master Mix*” para a reacção PCR, “*Master Mix*” para a sequenciação CLIP[®] e as misturas de terminação para CLIP[®].

Área 3 – amplificação por PCR, sequenciação e detecção CLIP[®]

Extracção do ADN do VHB

A extracção dos ácidos nucleicos da amostra foi realizada de forma automática usando o teste MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation, e o equipamento MagNA Pure Compact, da Roche Diagnostics[®]. Todos os reagentes e consumíveis para a extracção foram fornecidos pelo fabricante. Partindo de um volume de 400 µL de amostra de plasma obteve-se um volume final de 50 µL de eluído de ADN.

Na primeira fase da extracção dos ácidos nucleicos, ocorreu uma ruptura das células, através da digestão das proteínas por adição do tampão de lise e de proteinase K. De seguida o ADN, em solução, ligou-se às partículas magnéticas de vidro adicionadas.

Posteriormente ocorreu em simultâneo a separação magnética dos complexos partículas magnéticas de vidro – ADN e vários ciclos de lavagem.

Na fase final foi feita uma eluição do ADN a altas temperaturas, obtendo-se um volume final de eluição de 50 µL.

Este processo demorou aproximadamente 30 minutos.

TRUGENE[®] HBV Genotyping

Amplificação por PCR dos ácidos nucleicos

Adicionaram-se as amostras de ADN extraídas aos tubos de reacção, nos quais já se encontravam todos os constituintes necessários (iniciadores, mistura de dNTP's, tampão, DMSO, Sulfato de amónia e enzima) para ocorrer a amplificação por PCR.

Numa primeira fase a mistura foi aquecida a 94°C para desnaturar o ADN da amostra e expor os locais de ligação dos iniciadores. De seguida, a uma temperatura de 60°C, os iniciadores ligam-se ao ADN e a enzima, em presença de dNTP's em excesso, cataliza a reacção de amplificação para sintetizar uma segunda cadeia de ADN, a qual ocorreu a uma temperatura de 72°C.

Este processo de aquecimento/arrefecimento foi repetido por 35 vezes, cada ciclo duplicando a quantidade de produto amplificado (Tabela 5).

A reacção de amplificação por PCR demorou aproximadamente 2 horas e 10 minutos.

A amplificação ocorre apenas na região do genoma do VHB entre os iniciadores usados, não na sua totalidade e os produtos amplificados não necessitam de serem purificados.

O equipamento usado para a amplificação por PCR foi o termociclador Perkin Elmer 9600.

Sequenciação CLIP[®]

A sequenciação CLIP[®] revela informação sobre as regiões do antigénio de superfície (AgHBS) e da transcriptase reversa (rt).

As amostras amplificadas foram adicionadas a tubos de reacção que continham 2 iniciadores marcados com corante fluorescente diferentes (CyTM5 e CyTM5.5), os quais permitem a extensão de cada cadeia nos dois sentidos (directo e reverso).

Nos tubos de reacção também se encontram outros reagentes necessários (água livre de nucleases, tampão, dNTP's e enzima) para a extensão das cadeias de ADN, nomeadamente um dos quatro didesoxinucleótidos trifosfato (ddNTP) que terminam a cadeia de ADN (terminadores): didesoxiadenosina (ddATP), didesoxicitidina (ddCTP); didesoxiguanosina (ddGTP) ou didesoxitimidina (ddTTP) trifosfato.

A reacção de amplificação foi iniciada na presença de uma enzima CLIP[®], uma ADN polimerase termoestável com uma afinidade elevada para os ddNTPs.

À semelhança do que se passou na “Amplificação por PCR”, os tubos de reacção foram sujeitos a aquecimentos/arrefecimentos de forma a sintetizar novas cadeias de ADN. À

medida que os ddNTP's terminadores são adicionados à cadeia, a síntese da nova cadeia termina.

Na sequenciação CLIP[®] as amostras foram sujeitas a 30 ciclos de aquecimento/arrefecimento e esta reacção demorou aproximadamente 2 horas e 30 minutos (Tabela 5).

O equipamento usado para a sequenciação CLIP[®] foi o termociclador Perkin Elmer 9600.

Tabela 5. Programa de ciclos utilizados na amplificação por PCR e sequenciação CLIP[®] no termociclador Perkin Elmer 9600 (Bula nº 10469332 Bula nº 10469332 Rev.A, 2008-06).

Amplificação por PCR			Sequenciação CLIP [®]		
Nº ciclos	T ^a (°C)	Tempo	Nº ciclos	T ^a (°C)	Tempo
(*)	94	3 min	(*)	94	3 min
35	94	30 seg	30	94	30 seg
	60	30 seg		57	30 seg
	72	1 min e 15 seg		70	1 min e 30 seg
	72	3 min		70	3 min
Manter a 4°C			Manter a 4°C		

(*) Aumentar a temperatura (T^a) em rampa 1°C por segundo.

seg – segundos; min – minutos

Desnaturação dos produtos CLIP[®]

No final da sequenciação CLIP[®] adicionou-se uma solução de formamida com corante e os tubos de reacção foram aquecidos a uma temperatura de 85°C durante 3 minutos para ocorrer a desnaturação das diferentes cadeias de ADN formadas na sequenciação CLIP[®]. O equipamento usado para a sequenciação CLIP[®] foi o termociclador Perkin Elmer 9600.

Electroforese de produtos de reacção CLIP[®]

Colocou-se uma fracção dos produtos CLIP[®] numa cassette MicroCelTM500 contendo um gel de poliácridamida polimerizado vertical ultra fino formando uma matriz com poros específicos. A alta concentração de ureia contida no gel mantém os fragmentos de ADN num estado desnaturado em cadeia única. A aplicação de um campo eléctrico de alta tensão (2000 V) força os fragmentos de ADN carregados negativamente a migrar através do gel para o ânodo. Perto da parte inferior do gel, um raio laser excita o corante fluorescente ligado aos fragmentos de ADN que passam através do laser e os detectores determinam a quantidade de luz e o comprimento de onda produzido pelo corante fluorescente. Esta medição da luz é depois recolhida por um sequenciador e transmitida a uma estação de trabalho que armazena os dados. Cada reacção de sequenciação

necessita de quatro faixas, uma para cada um dos quatro dddNTP's (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) que terminam a cadeia. A electroforese decorreu a 60°C durante 70 minutos.

Análise das sequências CLIP®

As sequências de CLIP® directas e reversas foram combinadas e comparadas, pelo software do sistema, com as sequências consenso dos genótipos de A a G e assim foi determinado o genótipo da amostra em estudo. As mutações existentes em ambas as regiões do antigénio de superfície e rt do gene Pol também foram detectadas e registadas.

Análise do controlo negativo

Só foram considerados os ensaios cujos controlos negativos, apresentaram somente os picos dos iniciadores, em ambas as direcções, na visualização da curva. A intensidade dos picos foi sempre maior que 8000.

Análise do controlo positivo

Só foram considerados os ensaios cujos controlos positivos apresentavam sequências em ambas as direcções, bem alinhadas e sequências de base relacionadas com o VHB.

Só foram considerados controlos positivos válidos sequências com percentagem de homologia com o Genótipo A superiores a 90%, sem qualquer correcção na leitura dos electroferogramas, e superior a 93% após a mesma correcção.

Análise das amostras

Na análise dos dados só foram consideradas as amostras que apresentavam as duas sequências bem alinhadas e que possuíam sequências de base relacionadas com o VHB. Só foram consideradas amostras válidas as que apresentaram sequências com percentagem de homologia superior ou igual a 80% com a sequência consenso do genótipo em causa e sem qualquer correcção na leitura dos electroferogramas.

As sequências de CLIP directas e reversas foram combinadas e comparadas, pelo software do sistema, com as sequências consenso dos genótipos de A a G sendo assim determinado o genótipo da amostra em estudo. O software gera um relatório por amostra contendo a informação do genótipo e de mutações, se existentes.

Estes dados foram registados numa base de dados, utilizando a aplicação Microsoft® Office Excel® 2007, criada especificamente para o efeito tendo sido, posteriormente, complementados com os registos de estudos anteriores existentes no Sistema informático ASIS da base de dados dos doentes, do Centro Regional de Sangue do Porto.

Os dados da base de dados foram tratados estatisticamente através de tratamento uni e bivariado.

4 - RESULTADOS

Fizeram parte do estudo 228 amostras recepcionadas no Laboratório de Agentes Transmissíveis - Laboratório de Biologia Molecular do CRSP com pedido de genotipagem do VHB, durante o período de estudo (Setembro de 2008 a Dezembro de 2010).

A genotipagem do VHB foi efectuada em 164 (72%) do total de 228 amostras (Tabela 6).

Tabela 6. Total de amostras com genotipagem do VHB realizadas no CRSP no período do estudo.

Período do estudo	Nº total de amostras	Nº de Amostras com genotipagem	
		N	%
Set 2008 a Dez 2008	51	36	71
Jan 2009 a Dez 2009	58	43	74
Jan 2010 a Dez 2010	119	85	72
Totais	228	164	72

Das 64 amostras em que não foi feita a genotipagem, 52 apresentaram carga vírica (CV) do VHB <100 UI/mL e foram excluídas por não satisfazer o critério de inclusão da selecção da amostra do estudo (Figura 8). Das restantes 12 amostras, não se obteve amplificação em 7 amostras, 4 amplificaram em apenas 1 sentido e uma não foi validada por apresentar uma homologia inferior à recomendada pelo fabricante (Bula nº 10469332 Ver.A, 2008-06).

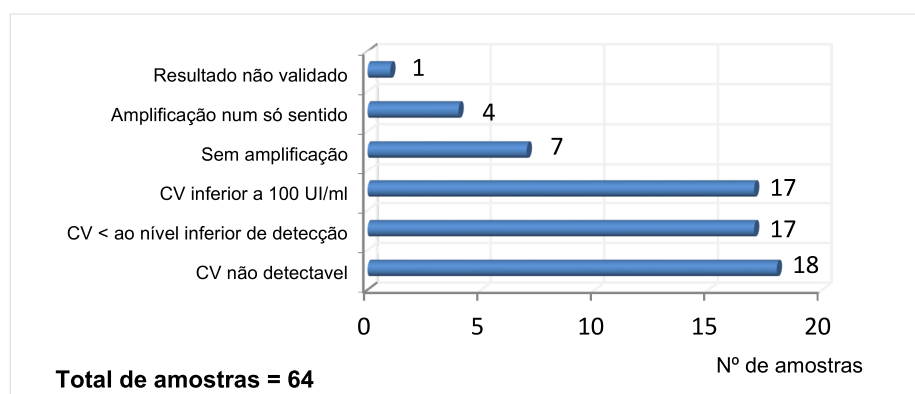


Figura 8. Distribuição das amostras pelas causas que justificaram a não determinação do genótipo do VHB. CV - carga vírica

4.1 – RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DOS GENÓTIPOS

Das 164 amostras submetidas à genotipagem do VHB, 106 correspondiam a doentes do sexo masculino (65%), e 58 ao sexo feminino (35%). A idade destes variou entre 19 e 79 anos, com média de $46,7 \pm 13,1$, mediana de 46 (Tabela 7). A média da carga vírica (CV) das amostras estudadas foi de $1,18 \times 10^8$ UI/mL tendo-se verificado valores de 105 UI/mL a $> 1,9 \times 10^{10}$ UI/mL.

Tabela 7. Caracterização da amostra submetida a genotipagem do VHB.

Média das idades \pm DP	46,7 \pm 13,1
(Max - Min)	(19-79)
Sexo (feminino / masculino)	58/106
Média das CV do ADN-VHB	$1,18 \times 10^8$
(intervalo UI / mL)	(105 - $> 1,1 \times 10^{10}$)
Total	164

DP- desvio padrão; CV - carga vírica

A distribuição das idades e do sexo dos doentes genotipados estão representados nas Figuras 9 e 10 respectivamente.

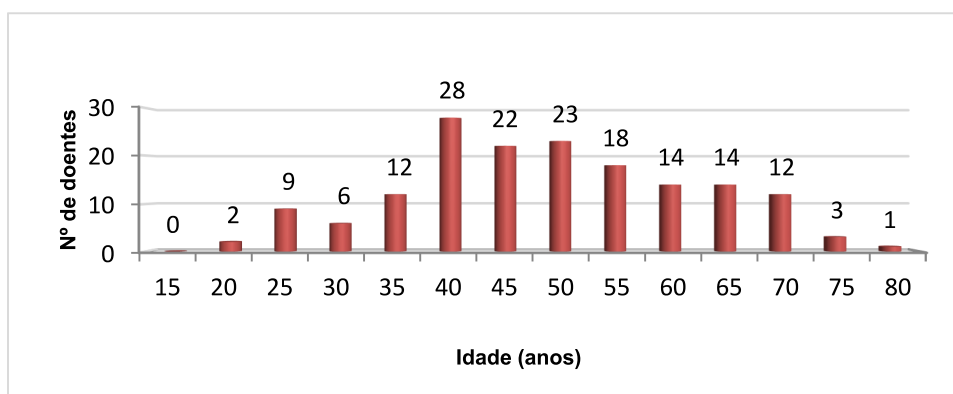


Figura 9. Distribuição das idades dos doentes em estudo.

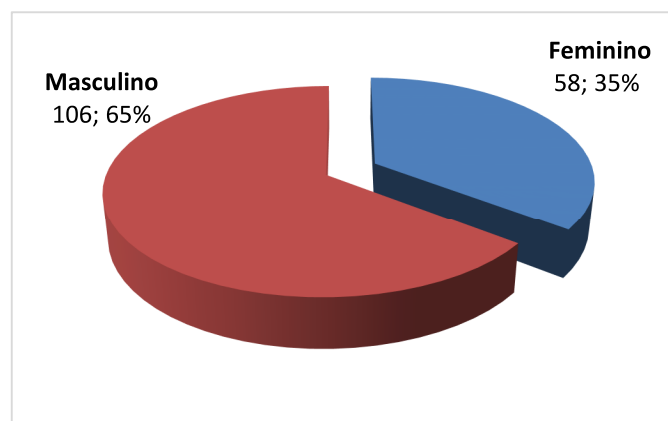


Figura 10. Distribuição por sexo dos doentes estudados.

Neste estudo foram identificados 5 dos 7 tipos de genótipos possíveis de se determinar pelo teste utilizado. O genótipo D foi o mais prevalente, detectado em 101 amostras estudadas (62%), seguido do genótipo A, em 53 amostras (32%). Não foram encontrados genótipos C nem G (Figura 11).

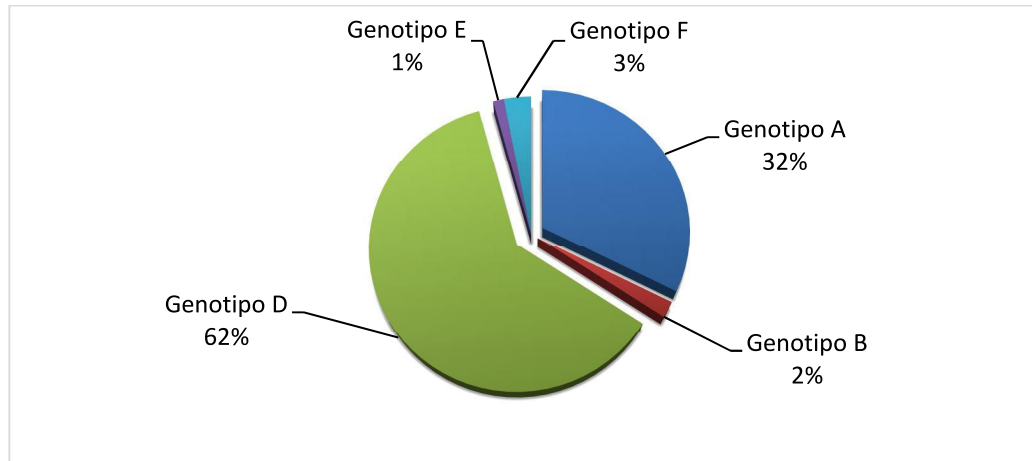


Figura 11. Distribuição dos genótipos das amostras com genotipagem determinada pelo Trugene® HBV Genotyping.

A caracterização do sexo, idade dos doentes pelos diferentes genótipos determinados, bem como os valores das CV são resumidamente apresentados na Tabela 8. Nas Figuras 12 e 13 podem ser observada mais detalhadamente. De realçar que o doente mais novo (19 anos), é do sexo masculino e estava contaminado com o VHB do genótipo

D sendo o doente mais velho (79 anos), do sexo feminino contaminado com VHB do genótipo A.

Tabela 8: Características dos doentes estudados por genótipos.

Genótipo do VHB	A	B	D	E	F	Total
Número	53	3	101	2	5	164
Percentagem	(32%)	(2%)	(62%)	(1%)	(3%)	(100%)
Idades (†) ± DP	48,7±11,5	45,9±16,2	45,5±13,8	60,0±9,9	46,0±10,4	46,7±13,1
(intervalo)	(26-79)	(9-65)	(19-72)	(53-67)	(34-61)	(19-79)
Sexo (feminino / masculino)	15/38	1/2	39/62	0/2	3/2	58/106
Percentagem	(28/72%)	(33/67%)	(39/61%)	(0/100%)	(60/40%)	(35/65%)
CV (UI / mL) †	3,8x10 ⁶	6x10 ⁷	1,84x10 ⁸	3,7x10 ⁸	4,8x10 ³	1,18x10 ⁸
(mínimo)	129	219	105	1030	223	105
(máximo)	1,7x10 ⁸	2,0x10 ⁸	1,1x10 ¹⁰	7,4x10 ⁸	1,0x10 ⁴	1,1x10 ¹⁰

† Média; DP- Desvio Padrão; CV – carga vírica.

Só foram detectados 10 casos para os genótipos B (3), E (2) e F (5) do total das 164 amostras estudadas. Por estes números não permitirem tirar inferências válidas, optou-se estudar apenas os genótipos A e D.

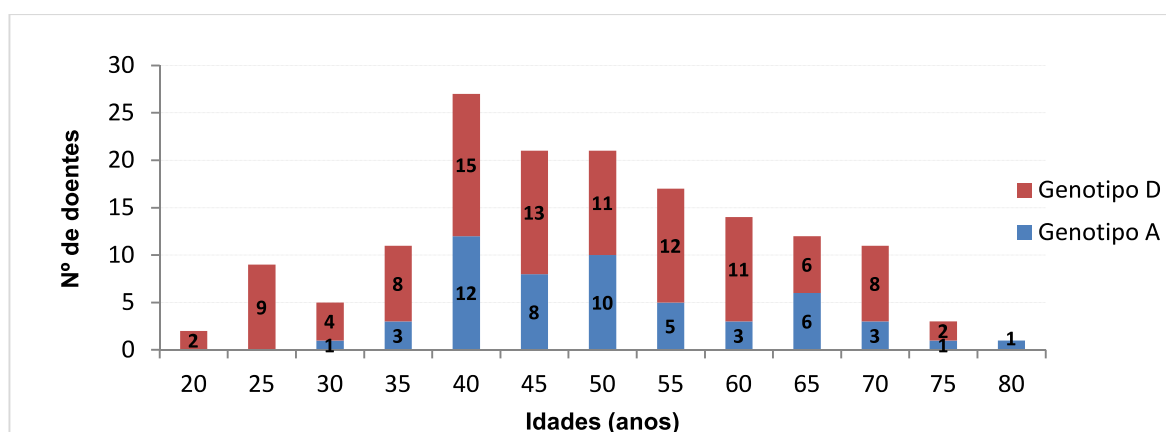


Figura 12. Distribuição das idades dos doentes estudados pelos genótipos A e D.

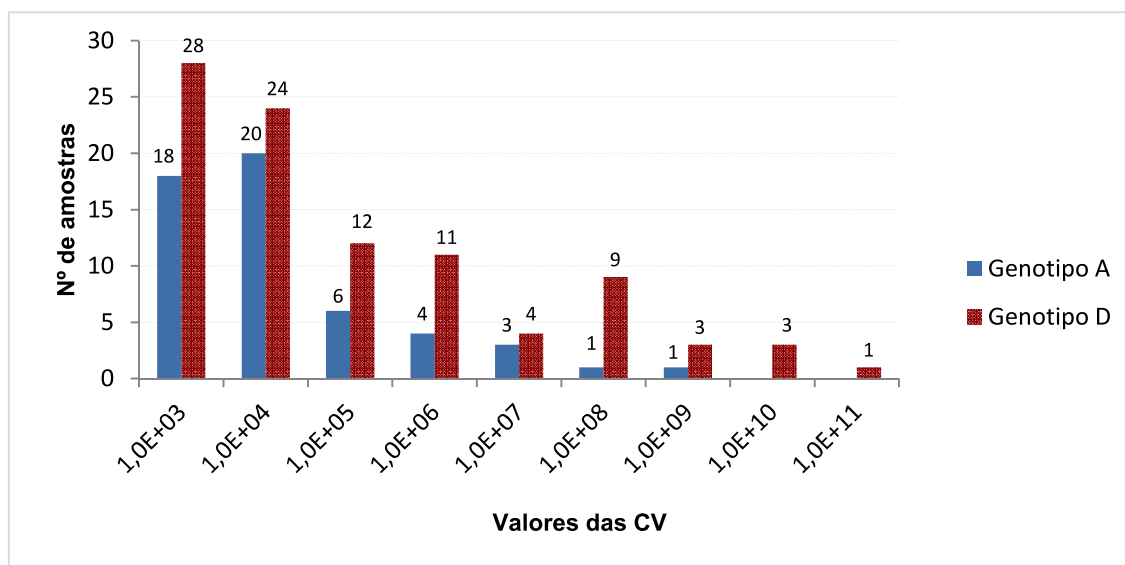


Figura 13. Distribuição da carga vírica (CV) das amostras pelos genótipos A e D.

A homologia obtida, após a análise das sequências CLIP das amostras genotipadas, pode ser observada na figura que se segue (Figura 14).

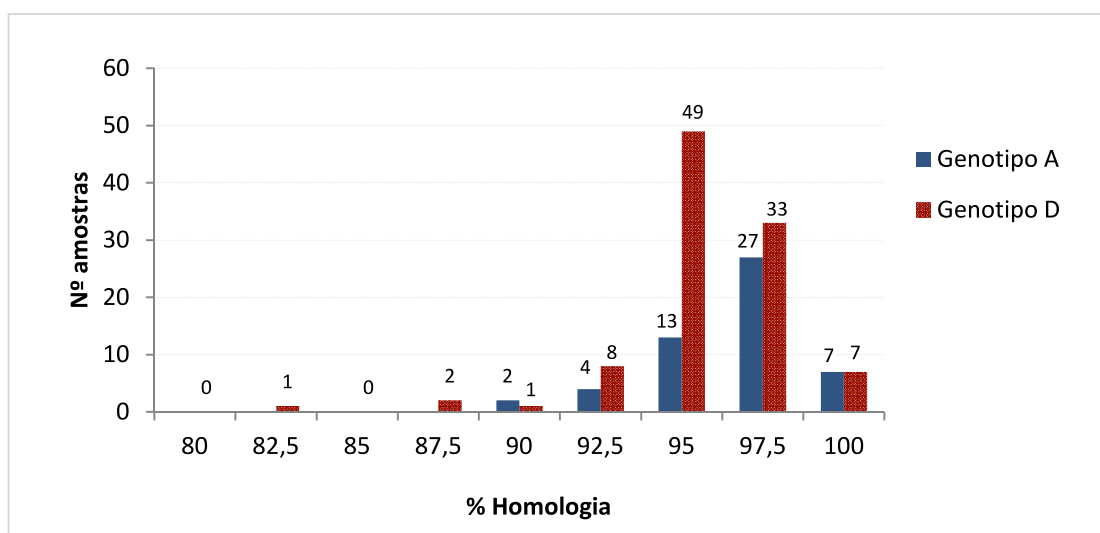


Figura 14. Distribuição da homologia obtida na genotipagem das amostras para os genótipos A e D.

A Figura 15 apresenta as homologias obtidas para os controlos positivos introduzidos nas diferentes séries de testes realizados durante o período do estudo.

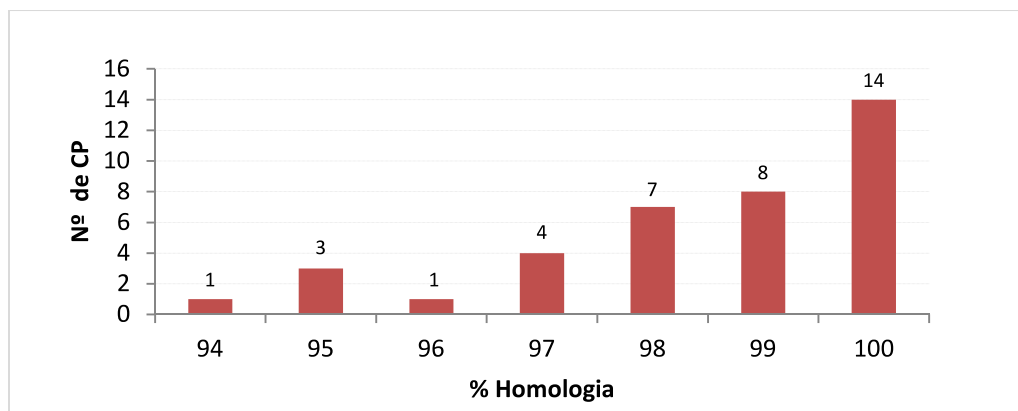


Figura 15. Distribuição da homologia obtida na genotipagem dos controlos positivos (CP) inseridos nas diferentes séries de testes realizados.

4.2 – COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS COM OUTROS ESTUDOS

Os resultados obtidos neste estudo foram comparados com os resultados de outros estudos equivalentes, realizados em Portugal. A comparação da prevalência dos genótipos A e D em quatro estudos realizados em Portugal foi efectuada pela análise dos Intervalos de Confiança a 95% (IC_{95%}) (Figuras 16 e 17).

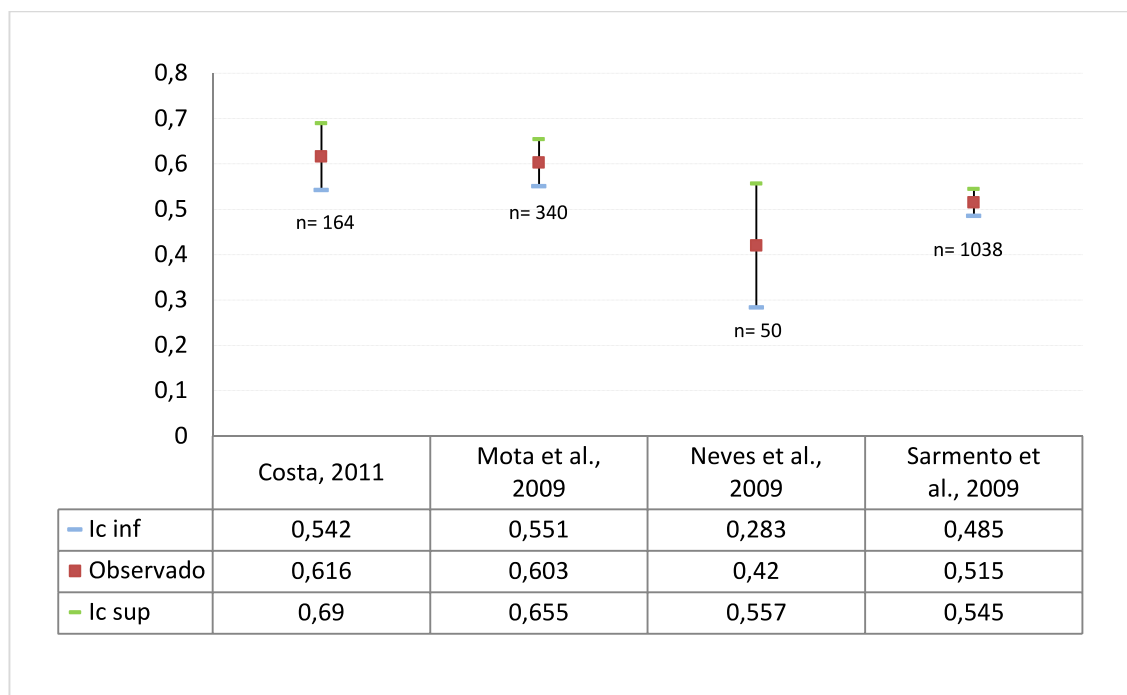


Figura 16. Comparação dos IC_{95%} para a prevalência dos genótipos D em 4 estudos.

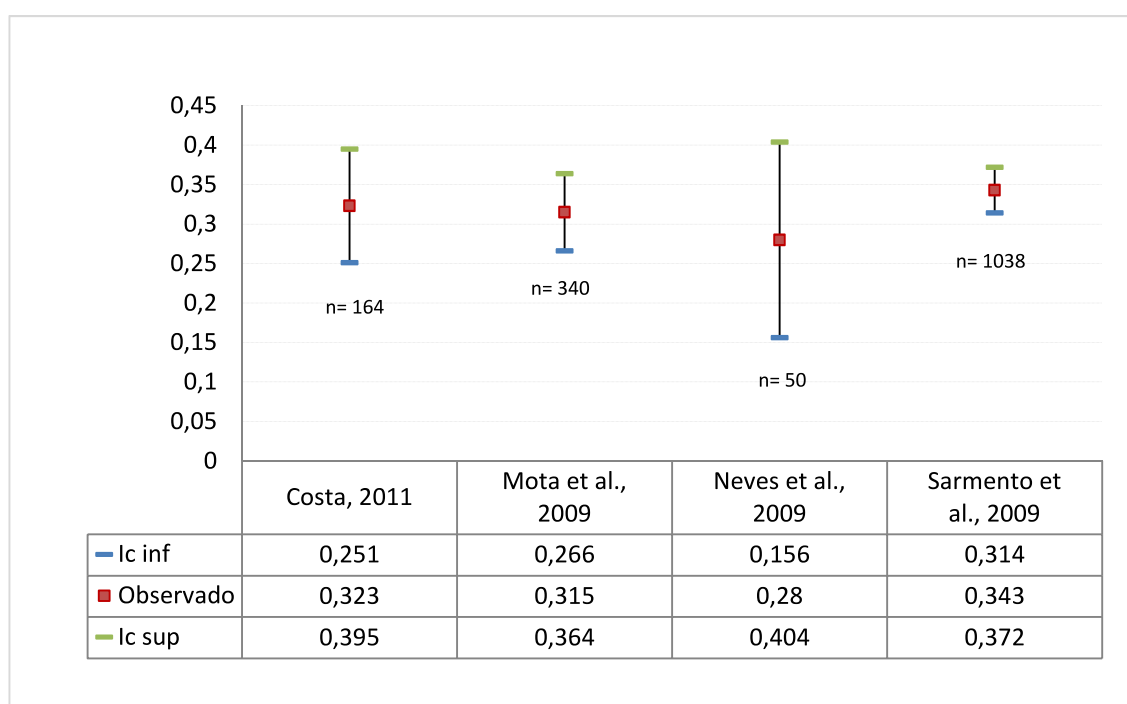


Figura 17. Comparação dos IC_{95%} para a prevalência dos genótipos A em 4 estudos.

4.3 – RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DAS MUTAÇÕES

Do total de 164 doentes genotipados, 22 (13,4%) apresentaram mutações que conferem resistências aos fármacos, actualmente aprovados e utilizados, no tratamento dos doentes com Hepatite B crónica. As características desses doentes podem ser consultadas na Tabela 9. De referir, que apenas foram encontradas essas mutações nos doentes com os genótipos A e D.

Tabela 9. Características dos doentes com genótipo A e D que possuem mutações que conferem resistências aos fármacos

Genótipo do VHB	A	D	Total
Número	7	15	22
Percentagem	(4,3%)	(9,1%)	(13,4%)
Idades (†) ± DP (intervalo)	44,1± 9,48 (35-62)	45,9 ± 15,66 (22-72)	44,6 ± 13,60 (22-72)
Sexo (feminino / masculino)	1/6	5/10	6/16
CV (UI / mL) †	1,4x10 ⁶	3,8x10 ⁷	2,6x10 ⁷
(mínimo)	1240	289	289
(máximo)	1,0x10 ⁷	4,6x10 ⁸	4,6x10 ⁸

† Média ; DP- Desvio Padrão; CV – carga vírica.

O Figura 18 representa a distribuição do total das resistências aos fármacos utilizados na terapêutica, por determinação das respectivas mutações. Todas as mutações determinadas conferem resistência à lamivudina (LMV) sendo também observadas resistências para o entecavir (ETV) e adefovir (ADF).

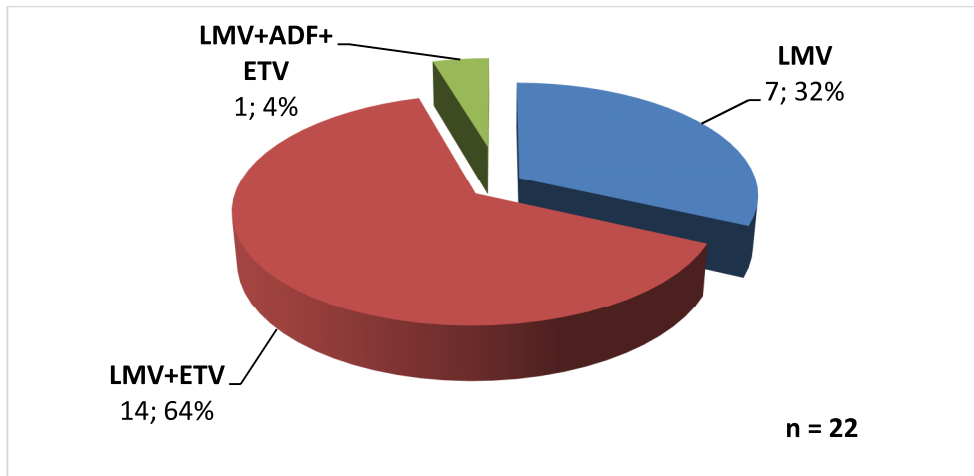


Figura 18: Distribuição do total das amostras com resistências aos fármacos: lamivudina (LMV), entecavir (ETV) e adefovir (ADF).

A Figura 19 apresenta a distribuição dessas resistências por genótipo. De referir que estas mutações são mais prevalentes no genótipo D existindo em 15 doentes (68%) do total dos 22 doentes que apresentaram mutações.

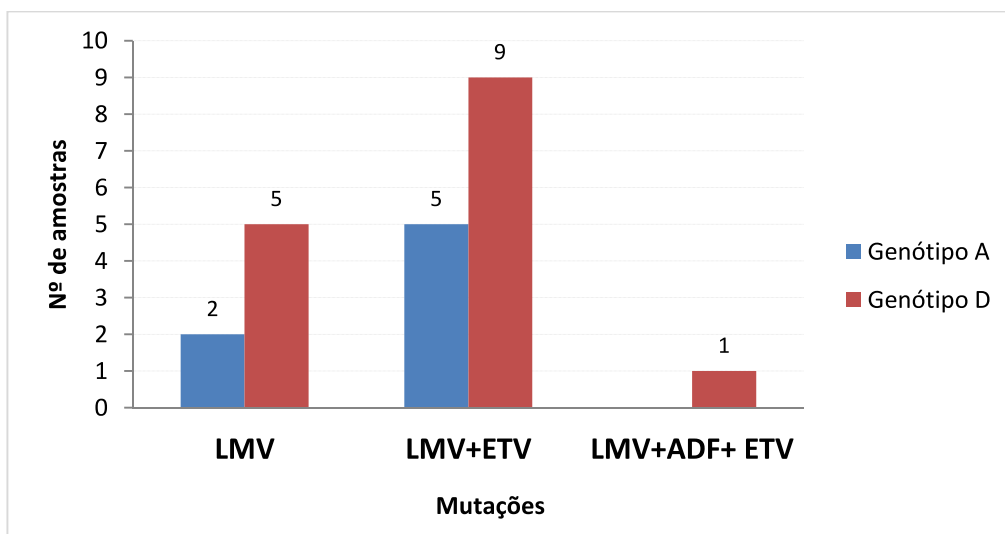


Figura 19. Distribuição do total das amostras com resistências aos fármacos lamivudina (LMV), entecavir (ETV) e adefovir (ADF), pelos genótipos A e D.

As mutações determinadas nos 22 doentes que as apresentam estão representadas na Figura 20.

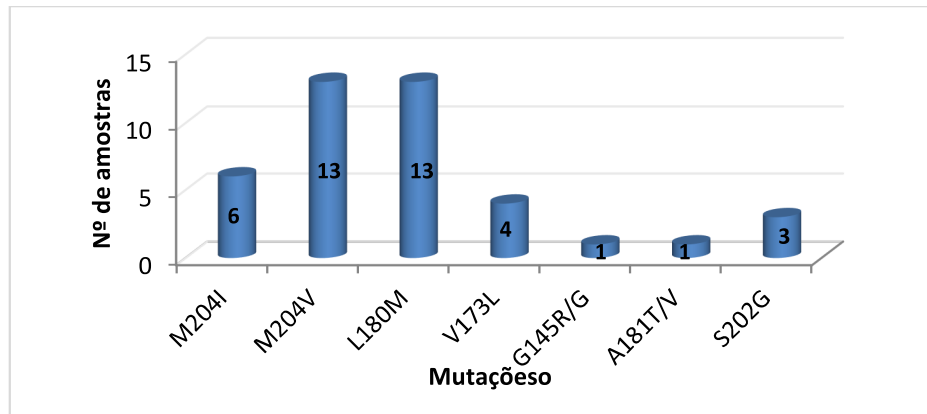


Figura 20. Distribuição da frequência das mutações observadas na amostra.

A análise das mutações correspondentes às resistências dos fármacos é apresentada na Figura 21.

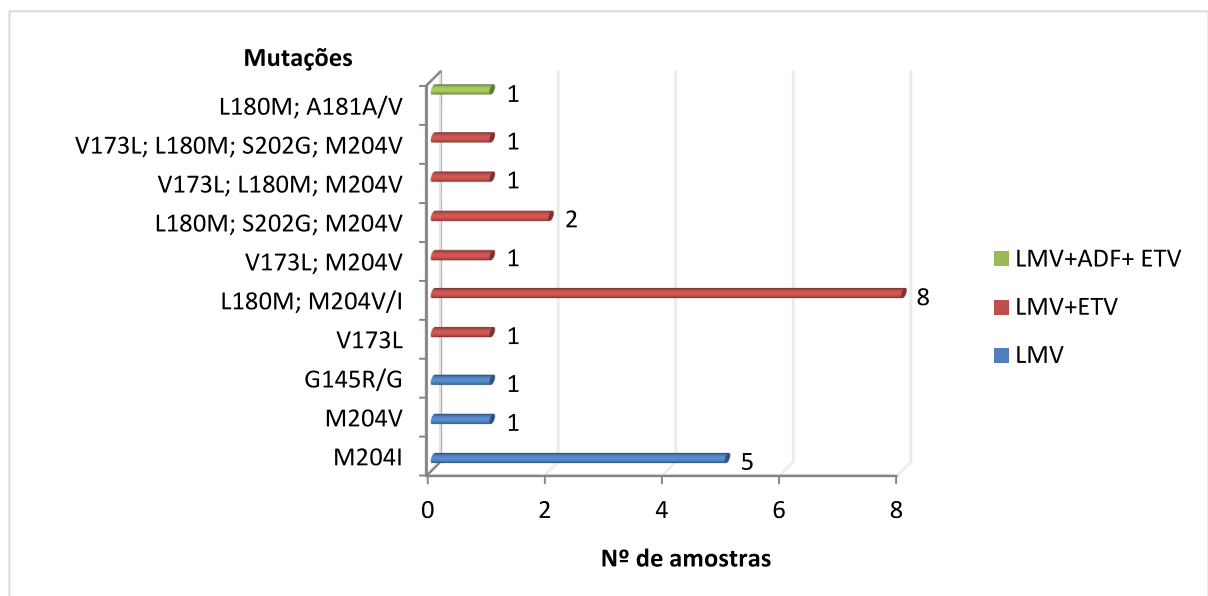


Figura 21. Associação da mutação e respectiva(s) resistência(s) ao(s) fármaco(s).

Os dados recolhidos sobre a terapêutica em curso dos doentes com mutações, obtidos a partir das requisições, permitiram identificar os seguintes casos:

- 2 doentes sem terapêutica
- 2 desconhece-se
- 11 com lamivudina de forma simples ou combinada
- 7 com entecavir

5 - DISCUSSÃO

A sequenciação do genoma completo do VHB e a sua análise filogenética é referida como sendo a técnica de referência para a genotipagem do VHB (Kessler et al., 2003; Wagner et al., 2004; Sablon and Shapiro, 2005; Guirgis et al., 2010). O facto de ser uma técnica cara, muito trabalhosa e morosa e de necessitar de pessoal com muita experiência e treino para analisar os resultados, constituíram limitações para a adaptar a rotinas laboratoriais com processamento de amostras em larga escala. Pela comparação das sequências do genoma completo com as sequências do gene de superfície (regiões préS/S) foi possível verificar que a sequenciação destas regiões (sequenciação parcial) também permitiam identificar com precisão os genótipos tendo sido adoptada como a principal estratégia para a genotipagem do VHB (Wagner et al., 2004).

Com base neste pressuposto, a determinação dos genótipos do VHB na população dos doentes com Hepatite B crónica com pedido de estudo no CRSP-IPS foi feita usando as sequências do gene do antigénio de superfície. A existência de um método já validado no Laboratório de Biologia Molecular do CRSP-IPS para a genotipagem do VHB, método por sequenciação directa usando o teste TRUGENE[®] HBV Genotyping comercializado pela SIEMENS[®], facilitou a determinação dos genótipos do VHB e a determinação das mutações deste vírus que conferem resistência aos fármacos.

O teste TRUGENE[®] HBV Genotyping, quando utilizado em conjunto com o sistema de sequenciação do ADN OpenGene[®], constitui um método que permitiu obter sequências bidireccionais da região do gene do antigénio de superfície sobreposta com a região da transcriptase reversa (rt) do gene da Polimerase do VHB nos domínios de B a E, que possibilitaram a determinação dos genótipos de A a G e em simultâneo a determinação das mutações que conferem resistências aos fármacos actualmente utilizados na terapêutica. Os genótipos foram determinados apenas a partir da região do antigénio de superfície, como anteriormente foi referido. As mutações foram determinadas pela análise das sequências de toda a região sequenciada.

Este teste tem como principais vantagens ser padronizado e automatizado. Permite determinar em simultâneo o genótipo e as mutações que conferem resistência aos fármacos, utilizados na terapêutica, com resultados em aproximadamente 6 horas, tal como foi referido por Kessler et al. (2003). A possibilidade de: poder parar o teste em

determinados passos da técnica e recomeçar posteriormente (não ultrapassando 72 horas); obter de forma automática as sequências que posteriormente são comparadas com as sequências consenso existentes no módulo Trugene HBV do software OpenGene e a emissão automática de um relatório com toda esta informação, são aspectos constatados ao longo da realização deste trabalho, favoráveis para que o método se molde às necessidades de uma rotina laboratorial. Há, no entanto, alguns pontos menos positivos, que se relacionam com o facto de este Kit não ter marca da Comunidade Europeia (marca CE), por ser um teste para uso apenas de investigação “*Research Use Only*” e não permitir a determinação dos génotipos H.

Este estudo apresentou algumas limitações. Estas incluem a falta de dados dos doentes estudados relativamente à informação clínica, resultados laboratoriais, e dados pessoais como a naturalidade e/ou nacionalidade e o tamanho da amostra estudada. Estas limitações não permitiram fazer algumas inferências que a ser possível poderiam contribuir para uma abordagem diferente deste trabalho.

A genotipagem do VHB foi realizada nas amostras de doentes com Hepatite B crónica que apresentavam, uma carga vírica (CV) superior a 100 UI/mL. O cumprimento deste critério não permitiu a determinação dos génotipos em 52 amostras (81,3%), do total das 64 amostras sem genotipagem, das quais 18 não apresentaram carga virica detectável.

De acordo com o fabricante o limite de detecção para o TRUGENE[®] HBV Genotyping é aproximadamente 2.0×10^3 cópias de ADN do VHB/mL (Kessler et al., 2003; Guirgis et al., 2010), ou seja, 400 UI/mL sendo que 1UI/mL é cerca de 5 cópias/mL (Allain, 2006;Guirgis et al., 2010). A realização da extracção do ADN do VHB, utilizando o teste MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation da Roche Diagnostics permite alcançar uma sensibilidade analítica de 200UI/mL (Gintowt et al., 2005). A validação do método no CRSP verificou que o teste TRUGENE[®] HBV Genotyping podia ser realizado em amostras com CV > a 100 UI/mL razão pela qual foi definido este valor como limite de detecção. Este aumento de sensibilidade da técnica, como foi verificado, contribuiu para diminuir o número de amostras excluídas do estudo por CV baixas.

Nas amostras estudadas (n=164) a maioria dos doentes pertenciam ao sexo masculino (65%). Dados da DGS e da ECDC referem que a infecção é mais comum no sexo masculino. Segundo a OMS, os homens são mais propensos a permanecer persistentemente infectados do que as mulheres, sendo estas, mais susceptíveis de

serem infectadas transitoriamente e de desenvolverem anti-HBs. Este facto poderá ser compreendido se associarmos ao sexo masculino, entre outros factores, o consumo excessivo de álcool e o uso de drogas hepatotóxicas que podem acelerar o curso da infecção pelo VHB (Ferreira and Borges, 2007).

Relativamente à idade constatamos que a média das idades é de $46,7 \pm 13,1$ anos. Os doentes apresentaram idades compreendidas entre 19 e 79 anos estando, mais de 50% dos doentes, classificados no grupo etário dos 25-55 anos. A maioria dos indivíduos com Hepatite B declarados à DGS encontra-se no mesmo grupo etário (DGS, 2007).

Da análise das idades, verificou-se que não existem doentes com idades inferiores a 19 anos na amostra estudada. Pode este facto ser o reflexo de várias medidas implementadas em Portugal no controlo e prevenção da doença designadamente na introdução da vacina do VHB no Programa Nacional de Vacinação (PNV). Em Portugal a administração da vacina começou por fazer parte do PNV a partir de 1994 para os adolescentes com idades compreendidas entre os dez e treze anos e grupos de risco.

No ano 2000 a vacina além de ser ministrada aos grupos referidos anteriormente passou a ser obrigatória para todos os recém-nascidos (Despacho nº 8707/99, Diário da Republica, II Série, nº 102 de 3 Maio). Em 2005, com a aplicação da Circular Normativa da DGS Nº 08/DT de 21/12/2005, a vacinação passa a contemplar as faixas etárias até aos 18 anos (DGS, 2006). A pesquisa do marcador serológico (AgHBs) a todas as grávidas com gravidez acompanhada, a administração de Imunoglobulinas específicas contra o vírus da Hepatite B (IgHB) nos recém-nascidos de mães com AgHbs positivo, o rastreio dos marcadores serológicos e moleculares a todos os dadores de sangue, hemoderivados e órgãos constituem recomendações da OMS, representam outras medidas preventivas.

As cargas víricas (CV) apresentaram uma variação muito grande sendo o valor de CV mais baixo de 105 UI/mL e o mais alto $1,1 \times 10^{10}$ UI/mL. O intervalo linear do teste utilizado neste trabalho, para quantificação do ADN do VHB, tal como já foi referido, é de 20 UI/mL a $1,7 \times 10^8$ UI/mL. Os resultados das CV com valores superiores ao definido no intervalo de linearidade do teste, foram obtidos por quantificação do ADN do VHB nas amostras diluídas. A variabilidade observada nos resultados das CV pode dever-se ao facto do doente estar ou não a fazer medicação e/ou dever-se ainda ao estadio da doença em que se encontra o doente. A falta de informação referente aos marcadores serológicos destes

doentes no momento do estudo limita a interpretação do estágio da infecção crónica em que se encontram os doentes estudados.

Da genotipagem da amostra estudada verificou-se que o genótipo D foi o mais prevalente, seguido do genótipo A, e com uma frequência menor os genótipos F, B e E. Estando os genótipos relacionados com a origem geográfica, podem nos estudos surgir genótipos com origem noutros países, uma vez que as populações estão em constante mudança devido aos movimentos migratórios e deslocações. A ausência de genótipos C e G pode estar explicada pelo baixo número de imigrantes provenientes das áreas onde estes genótipos são predominantes (Sudoeste Asiático, China, Japão para o genótipo C e Alemanha, França, E.U.A. para o genótipo G). Segundo o relatório do Serviço de Estrangeiros e Fronteiras (SEF) não existem muitos imigrantes provenientes destes países e a zona Norte do País não possui muitos imigrantes (SEF, 2010). Neste trabalho não foi possível verificar a relação do genótipo com a proveniência dos doentes uma vez que não possuíamos a informação da naturalidade de todos os doentes estudados.

A prevalência dos genótipos do presente estudo foi comparada com os resultados de outros estudos realizados em Portugal. O estudo realizado por Mota et al. em 2009 utilizou uma amostra de 340 doentes crónicos da região Norte e a prevalência encontrada para o genótipo D foi de 60.3% e para o genótipo A de 31,5%. Neves et al., em 2009 realizaram um estudo numa amostra de 50 candidatos a dadores de sangue do Centro Regional de Sangue de Lisboa que apresentaram AgHBs e ADN-VHB positivos. A prevalência encontrada para o genótipo D foi de 42% e para o genótipo A de 28%. Outro estudo em 2009 foi realizado por Sarmiento e colaboradores nos Hospitais da Universidade de Coimbra, numa amostra (n=1038) constituída por doentes com Hepatite B crónica seguidos em 5 hospitais e por candidatos a dadores de sangue de um Centro de Sangue (Norte, Centro e Sul). A prevalência encontrada para o genótipo D foi de 51,5% e para o genótipo A de 34,3%.

Tal como para este estudo, para os quatro estudos acima referidos, o genótipo D foi o mais prevalente seguido do genótipo A. Em relação ao genótipo A verifica-se, pela análise dos IC_{95%} a existência de sobreposição nestes intervalos, concluindo-se semelhança de proporção em todos os estudos. Relativamente ao estudo comparativo para o genótipo D verificou-se que o presente estudo apresenta uma prevalência completamente sobreponível com o estudo de Mota et al., sendo aparentemente mais

elevada quando comparado com os estudos de Neves et al. e Sarmiento et al. De referir que o estudo de Mota et al., tal como este, foi realizado em doentes da zona Norte e os restantes estudos foram realizados na zona Centro designadamente Coimbra e Lisboa. Esta pequena diferença pode ser explicada pelas características populacionais da área geográfica onde se realizou o estudo. Lisboa é o distrito de Portugal com mais população imigrante (SEF, 2010). O aumento do tamanho da amostra do estudo poderia ser útil para concluir destas diferenças.

A diferença verificada na distribuição por sexo e idade em relação aos genótipos A e D é explicada pela distribuição dos mesmos na amostra estudada. De referir que no intervalo de idades mais jovem destas amostras (20-30 anos), 90% dos doentes estão infectados com o vírus do genótipo D. Existem estudos que verificaram a associação da cirrose no fígado, em idades jovens (25 anos), sendo mais frequente nos doentes com genótipo A do que D (Kumar et al., 2005; Datta, 2008). Os doentes deste estudo podem apresentar um menor risco de desenvolver cirrose, uma vez que o genótipo A é muito pouco frequente nesta faixa etária. Relativamente aos restantes genótipos o número de doentes infectados é muito baixo e por isso não permite tirar conclusões.

Da análise dos valores das cargas víricas obtidas por quantificação do ADN- VHB na amostra deste estudo constatou-se que as CV são mais altas para o genótipo D em relação ao genótipo A (Figura 12). Um estudo epidemiológico realizado no Norte de Portugal também mostrou que os pacientes infectados com o genótipo D apresentavam níveis mais elevados de ADN-VHB (Mota et al., 2009).

As homologias (percentagem de bases que duas sequências têm em comum após segmentos de baixa afinidade terem sido removidos) obtidas na genotipagem das amostras apresentaram percentagens superiores ao que está definido pelo fabricante do teste. Segundo o fabricante a percentagem de homologia deverá ser superior ou igual a 80% com a sequência consenso do genótipo em causa e sem qualquer correcção na leitura dos electroferogramas. O mesmo se verificou em relação às amostras de controlo positivo inseridas nas diferentes séries de testes realizados. Todos os controlos positivos pertenciam ao genótipo A e apresentaram homologias acima dos 94% estando definido pelo fabricante homologia de 93%. De referir que a genotipagem não foi realizada em apenas uma amostra por apresentar uma homologia inferior às especificações mencionadas anteriores. Estes dados permitem verificar a exactidão do resultado final e a

consistência da metodologia utilizada no CRSP para a genotipagem dos doentes infectados com o VHB.

Das amostras estudadas verificou-se a existência de mutações que conferem resistência aos fármacos em 22 amostras (13,4%) e apenas nos genótipos A e D (Tabela 10). As mutações que conferem resistência à lamivudina (LMV) estão presentes em todas as amostras. Nos doentes que utilizam a LMV como terapia a longo prazo, existe um potencial para o aparecimento de mutantes com alterações no gene S em conjunto com mutações no locus YMDD da proteína da polimerase (Lok et al., 2000). Em alguns desses pacientes, a replicação do VHB pode ser restaurada por essas mutações na polimerase e resultar em recaída de hepatite B com evolução para doença hepática grave (Torresi, 2002). A frequência de mutações identificada neste estudo representa alguma preocupação. As mutações provocadas pelo uso de LMV no tratamento da hepatite B crónica podem ter impacto na saúde pública uma vez que nas populações onde ela é amplamente utilizada de forma contínua, por períodos de vários anos podem ocorrer vírus com alteração no antigénio de superfície associada a mutações de escape à vacina (Clements et al., 2010).

As mutações mais frequentemente encontradas foram as rtM204V e rtL180M tal como o que se encontra descrito para as resistências à LMV (Bartholomeusz and Locarnini, 2006). Estas mutações surgem de forma isolada ou combinadas com outras dependendo se apresentam resistência a um fármaco ou a vários fármacos. Os doentes que apresentaram resistências encontravam-se na maioria a fazer tratamento, em que 50 % deles estão medicados com LMV, e 32% com ETV no momento do pedido. Por consulta dos registos de estudos anteriores existentes no Sistema informático ASIS da base de dados dos doentes, do CRSP verificou-se que 86% dos doentes fizeram tratamento com LMV, a maioria por períodos superiores a 3 anos. Tem sido mostrado que a resistência à LMV aumenta progressivamente ao longo do tratamento: 14% a 32% dos pacientes tornam-se resistentes ao fármaco após cada ano desde o início do tratamento e mais de 80% apresentam resistências com 48 meses de tratamento (Dény and Zoulim, 2010).

Nos doentes com mutações constatou-se que os valores de CV são elevados (média de $2,6 \times 10^7$ UI/mL) encontrando-se em fase de grande replicação vírica. O aumento significativo da carga vírica nos doentes submetidos a terapêutica é a principal indicação para a realização de testes de resistência aos fármacos (Poordad and Chee, 2010).

6 - CONCLUSÕES

Nos últimos anos, a globalização da economia, a deslocação das populações dos países pobres para países ricos, e a disponibilidade da vacina e tratamento em áreas com melhores recursos têm modificado consideravelmente a distribuição do VHB. O conhecimento dos genótipos do VHB ajuda a compreender a origem da infecção, a prever a evolução clínica e ainda ser útil na monitorização da infecção pelo VHB no mundo.

Os métodos de genotipagem tornaram-se elementos cada vez mais importantes no diagnóstico laboratorial. Estas técnicas não são um substituto para os métodos convencionais normalmente utilizado na rotina mas sim, um complemento de informação para a monitorização dos doentes com hepatite B crónica.

Os dados do presente estudo indicam que na zona Norte de Portugal o genótipo D do VHB é mais predominante encontrando-se em 62% dos doentes estudados. Este resultado coincidiu com o observado noutros estudos idênticos realizados em Portugal bem como no Sul da Europa.

A determinação dos genótipos é essencial mas igualmente importante, será comparar o significado clínico dos diferentes genótipos encontrados numa mesma população no que respeita às suas implicações com a história natural, evolução clínica e resposta aos tratamentos.

A prevalência de mutações que conferem resistência aos fármacos foi de 13,4% e todas conferem resistência à Lamivudina tendo sido também observadas resistências para o Entecavir e Adefovir.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aljarallah BM. 2006. Hepatitis B Genotyping and its Clinical Implications. The Saudi Journal of Gastroenterology 12(3): 146-148.

Allain JP. 2006. Epidemiology of Hepatitis B virus and genotype. Journal of clinical Virology 36(1): S12-S17

Almeida D. 2009. Importância Clínica dos genótipos do vírus B. Gazeta Médica da Bahia 79(2): 39-40.

APEF - Associação Portuguesa para o Estudo do Fígado. 2008. Burden de Hepatologia. Disponível em: www.apecf.com.pt

Bartholomeusz A, Schaefer S. 2004. Hepatitis B virus genotypes: comparison of genotyping methods. Reviews in Medical Virology 14: 3-16.

Cao GW. 2009. Clinical relevance and public health significance of hepatitis B virus genomic variations. World J Gastroenterol 15(46): 5761-5769.

Carman WF, Zanetti AR, Karayiannis P, Waters J, Manzillo G, Tanzi E, Zuckerman AJ, Thomas HC. 1990. Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. The Lancet 336: 325-329.

Carvalho C, Neto S, Leal J, Mota P, Moreira C, Castro C. 2006. Estudo de Marcadores serológicos do vírus da Hepatite B numa população de dadores. ABO Revista de Medicina Transfusional 26: 39-42.

Coleman PF. 2006. Detecting Hepatitis B Surface Antigen Mutants. Emerging Infectious Diseases [Internet]. [citado 2011 Mar 12]; 12(3). Disponível em: "<http://www.medscape.com/viewarticle/522896>".

Clements CJ, Coghlan B, Creati M, Locarnini S, Tedder RS, Torresi J. 2010. Global control of hepatitis B virus: does treatment-induced antigenic change affect immunization? Bulletin of the World Health Organization 88: 66-73.

Datta S. 2008. An overview of molecular epidemiology of hepatitis B virus (HBV) in India. *Virology Journal* 5: 156.

Dény P, Zoulim F. 2010. Hepatitis B virus: From diagnosis to treatment. *Pathologie Biologie* 58: 245–253.

Diário da República nº102 de 3/5/99, despacho nº 8707/99. 2ª Série

Direcção Geral de Saúde. 2006. Programa Nacional de Vacinação 2006 Circular Normativa da DGS Nº 08/DT de 21/12/2005. Disponíveis em: "[http: www dgs.pt](http://www.dgs.pt)".

Direcção Geral de Saúde. 2007. Relatório de Doenças de declaração obrigatória 2002/2006. Disponíveis em: "<http://www.dgs.pt/upload/membro.id/ficheiros/i008987.pdf>".

Domati-Saad R, Scheuermann RH. 2006. Nucleic acid testing for viral burden and viral genotyping. *Clinica Chimica Acta* 363: 197-205.

EASL. 2009. EASL Clinical Practice Guidelines: Management of chronic hepatitis B. *Journal of Hepatology* 50: 227-242.

ECDC - European Centre for Disease Prevention and Control. 2010. Annual Epidemiological Report on Communicable Diseases in Europe 2010. Disponível em: "http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/1011_SUR_Annual_Epidemiological_Report_on_Communicable_Diseases_in_Europe.pdf".

Ferreira MS. 2000. Diagnóstico e tratamento da hepatite B. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 33(4): 389-400.

Ferreira MS, Borges AS. 2007. Avanços no tratamento da hepatite pelo vírus B. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 40(4): 451-462.

Fonseca JC. 2007. História natural da hepatite crônica B. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 40(6): 672-677.

Ganem D, Prince AM. 2004. Hepatitis B virus infection - Natural History and clinical consequences. *The new England Journal of Medicine* 350: 1118-1129.

Gintowt AA, Germer JJ, Mitchell PS, Yao JD. 2005. Evaluation of the MagNa Pure LC used with the TRUGENE TM HBV Genotyping Kit. *Journal of Clinical Virology* 34(2): 155-157.

Guirgis BS, Abbas RO, Azzazy HM. 2010. Hepatitis B virus genotyping: current methods and clinical implications. *International Journal of Infectious Diseases* 14: e941–e953.

Gunther S. 2006. Genetic variation in HBV infection: genotypes and mutants. *Journal of Clinical Virology* 36(1): S3-S11.

Hou J, Liu Z, Gu F. 2005. Epidemiology and Prevention of Hepatitis B Virus Infection. *International Journal of Medical Sciences* 2(1): 50-57.

Hwang EW, Cheung R. 2011. Global Epidemiology of Hepatitis B Virus (HBV) Infection. *North American Journal of Medicine and Science* 4(1):7-13.

Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. 2000. Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcomes in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology* 118: 554-559.

Kessler HH, Stelzl E, Marth E, Stauber RE. 2003. Detection of Mutation in the Hepatitis B Virus Polymerase Gene. *Clinical Chemistry* 49(6): 989-992.

Khoury ME, Santos VA. 2004. Hepatitis B: Epidemiological, Immunological, and Serological considerations emphasizing mutation. *Revista Hospitalar Clinica - Faculdade Medicina São Paulo* 59(4): 216-224.

Kumar A, Kumar SI, Pandey R, Naik S, Aggarwal R. 2005. Hepatitis B virus genotype A is more often associated with severe liver disease in northern India than is genotype D. *Indian Journal of Gastroenterology* 24: 19-22.

Lecour H, Ribeiro AT, Amaral I, Rodrigues MA. 1984. Prevalence of viral hepatitis markers in the population of Portugal. *Bulletin of the World Health Organization* 62(5): 743-747

Lima ML, Rodrigues G, Gonçalves H, Lino C, Carrapatoso C, Nogueira R. 2000. Rastreamento do antígeno HBs na população obstétrica da maternidade de Júlio Dinis. *Revista Portuguesa de Clínica Geral* 16(1): 35-42.

Lindh M, Gonzalez JE, Norkrans G, Horal P. 1998. Genotyping of hepatitis B virus by restriction pattern analysis. *Journal of Virological Methods* 72: 163-174.

Lok AS, McMahon BJ. 2007. AASLD Practice Guidelines: Chronic Hepatitis B. *Hepatology* 45(2): 507- 539.

Lok AS-F. 2000. Hepatitis B infection: pathogenesis and management. *Journal of Hepatology* 32(1): 89-97.

Maddalena C, Giambelli C, Tanzi E, Colzani D, Schiavani M, Milazzo L, Bernini F, Ebranati E, Cargnel A, Bruno R, Galli M, Zehender G. 2007. High level of genetic heterogeneity in S and P genes of genotypes D hepatitis B virus. *Virology* 365: 113-124.

Mahoney F. 1999. Update on diagnosis, management, and prevention of hepatitis B virus infection. *Clinical Microbiology Reviews* 12 (2): 351-366.

Méndez DK, Barboza L, Valles RC. 2007. Genotipos de Hepatitis B: Importancia Clínica. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 27(1): 349-363.

Mota A, Guedes F, Areias J, Pinho L, Cardoso MF. 2009. Epidemiological Study of Genotypes of hepatitis B Virus in Northern Portugal. *Journal of Medical Virology* 81: 1170-1176.

Neves I, Boavida N, Peres C, Rodrigues P, Castro L, Nascimento F. 2009. HBV Genotypes in Blood Donors of Lisbon Regional Blood Center [abstract]. Em: XIXth Regional Congress of the International Society of Blood Transfusion-Eastern Mediterranean and Europe; 2009 March 21-25; Cairo.

OMS - Organização Mundial de Saúde. 2008. Hepatitis B. Fact Sheet n. ° 204. Disponível em: "<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/> Poordad F, Chee GM. 2010".

Orito E, Ichida T, Sakugawa H, Sata M, Horike N, Hino K, Okita K, Okanoue T, Iino S, Tanaka E, Suzuki K, Watanabe H, Hige S, Mizokami M. 2001. Geographic Distribution of Hepatitis B Virus (HBV) Genotype in Patients With Chronic HBV Infection in Japan. *Hepatology* 34(3): 590-594.

Passadouro R. 2004. Prevalência e factores de risco das infecções por VIH, Hepatite B e C num estabelecimento presonal de Leiria. *Acta Méd Port* 17: 381-384.

Poordad F, Chee GM. 2010. Viral Resistance in Hepatitis B: Prevalence and management. *Curr Gastroenterol Rep* 12: 62-69.

Sablon E, Shapiro F. 2005. Advances in Molecular Diagnosis of HBV Infection and Drug Resistance. *International Journal of Medical Sciences* 2(1): 8-16.

Santos A, Carvalho A, Tomaz J, Rodrigues V, Coxinho L, Bento D, Sá R, Porto A. 2000. Prevalência dos marcadores de infecção pelo vírus da hepatite B na população adulta do distrito de Coimbra. *Acta Médica Portuguesa* 13: 167-171.

Sarmiento C, Ferreira C, Almeida AM, Silva E, Neto P. 2009. Molecular epidemiology of HBV in Portugal [abstract]. Em: XIXth Regional Congress of the International Society of Blood Transfusion-Eastern Mediterranean and Europe; 2009 March 21-25; Cairo.

Schaefer S. 2007. Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes. *World Journal of Gastroenterology* 13(1): 14-21.

Seeger C, Mason WS. 2000. Hepatitis B virus Biology. *Microbiology And Molecular Biology Reviews* 64(1): 51-68.

SEF - Serviço de Estrangeiros e Fronteiras. 2010. Relatório de Imigração Fronteiras e Asilo - 2009. Disponível em: "<http://sefstat.sef.pt/relatorios.aspx>".

Sheldon J, Rodès B, Zoulim F, Bartholomeusz A, Soriano V. 2006. Mutations affecting the replication capacity of the hepatitis B virus. *Journal of Viral Hepatitis* 13: 427-434.

Soriano V, González-Lahoz J. 2008. *Biología Molecular para Clínicos: Publicaciones Permanyer*. p.131-143.

Stuyver LJ, Locarnini SA, Lok A, Richman DD, Carman WF, Dienstag JL, Schinazi RF and the HEP DART International Committee. 2001. Nomenclature for Antiviral-Resistant Human Hepatitis B Virus Mutations in the Polymerase Region. *Hepatology* 33(3):751-757.

Torresi J. 2002. The virological and clinical significance of mutations in the overlapping envelope and polymerase genes of hepatitis B virus. *Journal of Clinical Virology* 25: 97-106.

Ulmer T. 2007. European orientation towards the Better Management of Hepatitis B in Europe. Disponível em:
http://www.hepatitisinfo.org/pdf/European_Policy_Recommendations.pdf.

Valderrama SL, Cortés JÁ, Cuervo SI. 2007. Tratamiento para la infección por hepatitis B crónica. *Asociación Colombiana de Infectología* 11(4): 201-210.

Valsamakis A. 2007. Molecular testing in the diagnosis and management of chronic Hepatitis B. *Clinical Microbiology Reviews* 20(3): 426-439.

Vernet G. 2004. Molecular diagnostics in Virology. *Journal of Clinical Virology* 31: 239-247.

Wagner A, Denis F, Ranger-Rogez S, Loustaud-Ratti V, Alain S. 2004. Génotypes du virus de l'hépatite B Hepatitis B virus genotypes. *Immuno-analyse & Biologie spécialisée* 19: 330-342.

Yin JH, Zhao J, Zhang HW, Xie JX, Li WP, Xu GZ, Shen J, Dong HJ, Zhang J, Wang L, Han JK, Wang HY, Cao GW. 2010. HBV genotype C is independently associated with cirrhosis in community-based population. *World Journal Gastroenterology* 16(3): 379-383.